UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

GABRIELA LOURENÇON IOSHIMOTO

Estudo terapêutico do implante intravítreo de ácido micofenólico em uveíte
autoimune experimental

São Paulo

2015

GABRIELA LOURENÇON IOSHIMOTO

Estudo terapêutico do implante intravítreo de ácido micofenólico em uveíte
autoimune experimental

Tese apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências
Área de Concentração: Neurociências e
Comportamento
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dora Fix
Ventura
Coorientador: Dr. Francisco Max
Damico

São Paulo

2015

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

Catálogo na publicação

Biblioteca Dante Moreira Leite

Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Ioshimoto, Gabriela Lourençon.

Estudo terapêutico do implante intravítreo de ácido micofenólico em uveíte autoimune experimental / Gabriela Lourençon Ioshimoto; orientadora Dora Selma Fix Ventura. -- São Paulo, 2015.

95 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Uveíte autoimune experimental 2. Ácido micofenólico 3. Implante intravítreo 4. Eletroretinograma 5. Morfologia I. Título.

BF241

DEDICATÓRIA

À minha família, com amor e gratidão por seu incansável apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Dora Fix Ventura e ao meu co-orientador, Dr. Francisco Max Damico, que nos anos de convivência, através de muita paciência e dedicação, contribuíram para meu crescimento científico, tornando possível a realização deste estudo.

À professora Dra. Dânia E. Hamassaki, por ceder o Laboratório de Biologia Celular da Retina do ICB I, USP para a realização dos experimentos morfológicos deste trabalho. Também agradeço à técnica de seu laboratório, Priscila Sayami, por doar seu tempo e ensinar as técnicas morfológicas.

À Dra. Einat Hauzman, por sua ajuda e paciência em me ensinar as técnicas de imuno-histoquímica.

Ao Dr. Balázs Vince Nagy, por colaborar na estatística e ajudar a solucionar os problemas técnicos do ERG.

Ao doutorando André Maurício Passos Liber, pela sua ajuda fundamental na parte prática do ERG e nos exames de biomicroscopia.

À aluna de iniciação científica, Amanda Bastos, por sua colaboração na realização dos ERGs.

Ao Prof. Armando da Silva Cunha Jr. e seu aluno de doutorado, Ricardo Martins Duarte Byrro (UFMG), pela parceria e por fornecer os implantes intravítreos de MPA.

Ao Dr. Leandro Zacharias, pela sua colaboração com a introdução dos implantes intravítreos.

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

Aos secretários Claudiel Luiz dos Santos e Sonia Maria Caetano de Souza.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

IOSHIMOTO, G. L. Estudo terapêutico do implante intravítreo de MPA em uveíte autoimune experimental. 2015. Tese (doutorado) – Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

Uveítes são inflamações intraoculares geralmente crônicas e uma das principais causas de cegueira no mundo. Os corticosteroides são as drogas de primeira escolha para o tratamento das uveítes autoimunes, mas, muitas vezes, há necessidade do uso de outras drogas imunossupressoras, como o micofenolato de mofetila, uma pró-droga, que é rapidamente convertida em ácido micofenólico (MPA) e tem se mostrado eficaz no tratamento de uveíte autoimune, reduzindo e estabilizando a inflamação. Contudo, tanto os corticosteroides quanto os imunossupressores estão associados aos efeitos colaterais graves que podem levar à necessidade de diminuição da dose ou à suspensão da droga. Assim, como uma alternativa às vias tradicionais (sistêmica e tópica) e visando diminuir os efeitos colaterais, este trabalho tem como objetivos ¹⁾ verificar a viabilidade do implante intravítreo de liberação lenta de MPA em coelhos saudáveis, ²⁾ reproduzir o modelo de uveíte autoimune experimental (UAE) em coelhos através da injeção intravítrea de *M. tuberculosis* e ³⁾ avaliar os efeitos terapêuticos do implante biodegradável de MPA em modelos de uveíte autoimune experimental (UAE) através de análises longitudinais clínicas e eletrorretinográficas e, após 50 dias, de análises morfológicas.

Nossos resultados mostraram a viabilidade do implante intravítreo de MPA e indicaram que o modelo de UAE desenvolveu uma uveíte anterior autolimitada, com pico de inflamação em 21 dias indicado pelo aumento de células na câmara anterior, flare e hiperemia conjuntival, assim como pela diminuição das amplitudes e aumento dos picos de latências. Com relação ao estudo do efeito terapêutico no modelo de UAE, os exames clínicos demonstraram que o implante de MPA foi capaz de diminuir o grau de uveíte durante o pico da inflamação, reduzindo a hiperemia conjuntival, as células presentes na câmara anterior e o flare. Porém, após 35 dias de tratamento, foi observado o descolamento da retina em 60% dos animais.

Os resultados eletrorretinográficos também apontaram uma redução da inflamação através da recuperação das amplitudes das ondas-*b* escotópicas e dos picos de tempo implícito das respostas fotópicas tanto da onda-*a* quanto da onda-*b* nos animais tratados. Após 50 dias de tratamento, a imunohistoquímica revelou que o grupo tratado apresentava menos ativação das células da glia, indicando uma diminuição do processo inflamatório.

A partir desses resultados, podemos concluir que o implante intravítreo de liberação lenta de MPA apresentou um efeito terapêutico no pico da inflamação, indicando uma diminuição do grau da doença e uma recuperação dos fotorreceptores, das células bipolares ON e das células de Müller, as quais foram alteradas com a inflamação. Nossos resultados também sugerem que o efeito terapêutico de MPA ocorre quando a concentração da droga se aproxima de 700 ng/mL no vítreo, pois a diminuição da inflamação ocular coincidiu com o aumento da taxa de liberação do MPA no vítreo.

Palavras-chave: uveíte autoimune experimental, ácido micofenólico, implante intravítreo, eletrorretinograma, morfologia.

ABSTRACT

IOSHIMOTO, G. L. Therapeutic study of the MPA intravitreal implant in the experimental autoimmune uveitis. 2015. Tese (doutorado) – Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

Chronic uveitis are generally intraocular inflammations and the major cause of blindness in the world. The corticosteroids are the drugs of first choice for the treatment of autoimmune uveitis, but is often need for use of other immunosuppressive drugs. However, both immunosuppressants and corticosteroids are associated with serious side effects that may lead to the need for dose reduction or discontinuation of the drug. As an alternative to traditional drug delivery (systemic and topical) and to reduce the side effects, this study aims ¹⁾ to verify the viability of intravitreal MPA implant in the control rabbits, ²⁾ to reproduce the experimental autoimmune uveitis model (EAU) induced with *M. tuberculosis* and ³⁾ to evaluate the therapeutic effects of MPA biodegradable implant in EAU rabbits through ERG and clinical longitudinal analysis and morphological analyzes after 50 days.

The results confirmed the viability and tolerance of the MPA intravitreal implant. The EAU model developed a self-limiting anterior uveitis, an inflammation peak at 21 days indicated by the increase in the anterior chamber cells, flare and conjunctival hyperemia. The ERG showed that this model present a decrease of the amplitudes and an increase of the implicit times. Our clinical results showed that the MPA implant decreased the uveitis degree during the peak of inflammation reducing conjunctival hyperemia, the presence of cells in the anterior chamber and the presence of flare. However, after 35 days of treatment, we observed retinal detachment in 60% of animals. Electroretinography results also showed a reduction of inflammation through the recovery of the scotopic *b*-waves amplitude and implicit time of the photopic responses of both *a*- and *b*-waves for the treated group. After 50 days of treatment, immunohistochemistry revealed that the activation of glial cells had become smaller without, indicating a reduction of the inflammatory process.

With these results, we concluded that MPA intravitreal implant suppressed the inflammation during the peak of inflammation in a rabbit model of uveitis. And besides reducing the clinical signs of disease, the drug recovered the photoreceptors, ON bipolar and Müller cells functions that have been altered by inflammation. Our results suggest that the therapeutic effect of MPA occurs when the drug concentration approaches 700 ng / mL in the vitreous.

Keywords: experimental autoimmune uveitis, mycophenolic acid, intravitreal implant, electroretinogram, morphology.

PREFÁCIO

Em 2008, o Laboratório da Visão (Instituto de Psicologia/USP), chefiado pela Professora Dra. Dora Fix Ventura e o oftalmologista Dr. Francisco Max Damico (Faculdade de Medicina/USP) iniciaram uma linha de pesquisa cujo objetivo é traçar o perfil toxicológico de drogas ao serem injetadas no olho, como adalimumabe, acetato de triancinolona e ácido micofenólico. Os estudos iniciais são realizados em coelhos saudáveis através da morfologia e eletrofisiologia (Manzano *et al*, 2011; Damico *et al*, 2012; Gasparin *et al*, 2014).

Como parte dos estudos descritos acima, este trabalho iniciou uma etapa nova e reproduziu um modelo de uveíte autoimune experimental (UAE) em coelhos, com o qual se avaliou o efeito terapêutico do implante intravítreo de ácido micofenólico (MPA), uma potente droga imunomoduladora cada vez mais utilizada clinicamente pela via sistêmica no tratamento da uveíte autoimune. Com isso, o presente trabalho será apresentado em três capítulos:

Capítulo 1: Estabelecer o perfil de segurança do implante biodegradável intravítreo do ácido micofenólico (MPA) na dose de 200 µg, através de estudos farmacocinéticos da liberação da droga no vítreo pelo implante intravítreo e de estudos eletrofisiológicos e morfológicos da retina.

Capítulo 2: Reproduzir o modelo de uveíte autoimune experimental em coelhos e avaliar o modelo através da eletrofisiologia e morfologia da retina.

Capítulo 3: Determinar os efeitos terapêuticos do implante biodegradável intravítreo de MPA (200 µg) no modelo padronizado do capítulo 2.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Uveíte.....	1
1.2. Micofenolato de mofetila.....	3
1.3. Implante intravítreo biodegradável	6
1.4. Eletrorretinograma	7
2. OBJETIVOS GERAIS	11

Capítulo 1

<i>Estudo eletrofisiológico, morfológico e farmacológico do implante biodegradável de ácido micofenólico em coelhos saudáveis</i>	<i>12</i>
---	-----------

1. OBJETIVOS	13
2. MÉTODOS	14
2.1. Animais.....	14
2.2. Implante biodegradável intravítreo de MPA	14
2.3. Estudo da farmacocinética dos implantes de MPA	16
2.4. Eletrofisiologia.....	17
2.5. Morfologia	19
2.5.1. Análises Histopatológicas das Retinas	20
2.5.2. Imuno-histoquímica para identificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP).....	20
3. RESULTADOS	22
3.1. Estudo farmacocinético.....	22
3.2. Estudo eletrofisiológico	23
3.3. Análise morfológica: Microscopia de luz e Imuno-histoquímica.....	29
4. DISCUSSÃO	32

Capítulo 2

<i>Análise eletrofisiológica e morfológica do coelho modelo de uveíte autoimune experimental</i>	<i>33</i>
--	-----------

1. OBJETIVOS	34
2. MÉTODOS	35
2.1 Animais.....	35
2.2. Indução da uveíte autoimune experimental (UAE)	35
2.3. Eletrofisiologia.....	36
2.4. Morfologia	37

2.4.1. Análises Histopatológicas das Retinas	37
2.4.2. Imuno-histoquímica para identificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	38
3. RESULTADOS	39
3.1. Estudo eletrofisiológico	39
3.2. Biomicroscopia	47
3.3. Análise morfológica: Microscopia de luz e Imuno-histoquímica.....	48
4. DISCUSSÃO	50

Capítulo 3

<i>Avaliação do efeito terapêutico do implante intravítreo de ácido micofenólico no modelo de uveíte autoimune experimental em coelho</i>	53
1. OBJETIVOS	54
2. MÉTODOS	55
2.1. Animais	55
2.2. Eletrofisiologia.....	55
2.3. Morfologia	56
2.3.1. Análises Histopatológicas das Retinas	56
2.3.2. Imuno-histoquímica para identificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	57
3. RESULTADOS	58
3.1. Estudo eletrofisiológico	58
3.2. Biomicroscopia	68
3.3. Análise morfológica: Microscopia de luz e Imuno-histoquímica.....	69
4. DISCUSSÃO	71
5. CONCLUSÃO GERAL	75
6. REFERÊNCIAS	77
7. ANEXO.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uveíte

Uveíte é a inflamação da úvea, uma camada vascular localizada entre a esclera e a coróide. O termo uveíte compreende um grupo heterogêneo de doenças inflamatórias oculares, é uma das principais causas de cegueira no mundo e seu impacto socioeconômico é significativo, pois acomete ambos os sexos, principalmente, indivíduos economicamente ativos entre a 3ª e a 5ª décadas de vida (Darrell *et al*, 1962; Gomi *et al*, 1997; Smet *et al*, 2011).

A uveíte não é uma doença única, pois a inflamação pode acometer qualquer parte da úvea (íris, corpo ciliar ou coróide), mas um grupo de doenças que diferem na apresentação e evolução clínica. O olho pode ser o único órgão envolvido ou a uveíte pode fazer parte de uma síndrome que acomete vários tecidos (Kanski, 1999). Os principais sinais e sintomas da uveíte são: hiperemia ocular, dor ocular, fotofobia, epífora, embaçamento, presença de células inflamatórias intraoculares, catarata, escotoma e moscas volantes.

A uveíte pode ser não infecciosa (autoimune) ou infecciosa. A uveíte autoimune, que será estudada neste trabalho, pode ser desencadeada por estímulos ambientais, genéticos e imunológicos, mas muitas vezes, o agente causador da inflamação é desconhecido ou indetectável. A uveíte infecciosa pode ser causada por diversos agentes etiológicos, como: fungos, bactérias, protozoários, helmintos e vírus (Kullkarni, 2001).

A uveíte também pode ser classificada de acordo com a localização anatômica da inflamação (posterior, anterior, intermediária ou difusa), o curso clínico (aguda, crônica, recorrente), e a histopatologia (granulomatosa ou não granulomatosa) (Chams *et al*, 2009).

Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 10% dos casos de cegueira sejam causados por uveíte (Nussenblatt, 1990; Suttorp- Schulten, 1996). Não há estudos de prevalência de uveíte no Brasil. Um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo baseou-se em prontuários de 262 pacientes e apontou os seguintes dados: a idade média dos pacientes era de 41 anos, 60% dos pacientes eram do sexo feminino e 65% dos portadores de uveíte apresentaram complicações que levaram

a perda da acuidade visual (Gouveia *et al*, 2004).

1.1.1 Uveíte autoimune experimental (UAE)

Assim como em qualquer modelo experimental de doença, nenhum modelo animal de uveíte autoimune consegue reproduzir o espectro completo da inflamação ocular humana; cada modelo possui características específicas que o torna apropriado para estudar aspectos particulares da doença. No caso dos estudos relacionados com a uveíte autoimune idiopática, um modelo bem caracterizado, cuja doença é específica do olho e mediada pelo linfócito T, é o modelo de uveíte autoimune experimental (UAE) (Commodaro *et al*, 2010), o qual pode ser induzido em animais após a imunização com autoantígenos retinianos (como a proteína retiniana ligadora de fotoreceptores (IRBP) e o antígeno S (arrestina)) ou pela transferência passiva de células T específicas para estes antígenos (Mochizuki *et al*, 1985; Rizzo *et al*, 1996; Caspi, 2006; Caspi *et al*, 2008).

O processo de desenvolvimento UAE se resume em duas etapas:

Etapas 1: A inflamação se inicia quando os linfócitos T ativados na periferia conseguem migrar até o tecido ocular, atacando seus antígenos como se fossem estranhos ao organismo. Isso porque, clones de linfócitos T, que escaparam dos mecanismos de tolerância central, presentes nos linfonodos drenantes são ativados e sofrem expansão clonal. Neste momento, as células T passam por um processo de reconhecimento para ignorar as proteínas do próprio organismo e, caso haja uma falha neste processo de autoreconhecimento, ocorre um segundo controle: a tolerância periférica. Contudo, no caso da inflamação ocular, a barreira hematoretiniana ocasiona uma persistência na população de células T não-tolerantes, que ao entrar em contato com o antígeno, desencadeia uma uveíte.

Etapas 2: Após entrar em contato com um estímulo imunogênico (ex: lesão mecânica, antígenos da retina), os linfócitos são ativados, podendo resultar na indução da autoimunidade. O reconhecimento do seu antígeno-específico no interior do olho mantém o estado ativado das células T específicas da retina, secretando citocinas que causam alterações inflamatórias no tecido: dor, hiperemia, edema, e, até mesmo, perda da função (Chan & Li, 1998; Sonoda *et al*, 2003; Caspi, 2011).

Na literatura, roedores como ratos e camundongos são os principais animais estudados como modelos da UAE, porém, neste estudo, o tamanho do globo ocular desses pequenos animais inviabilizaram seus usos devido ao tamanho do implante

intravítreo utilizado neste trabalho. Por isso, reproduzimos um modelo de uveíte autoimune experimental em coelhos, no qual a indução é feita através da injeção subcutânea seguida da injeção ocular do antígeno tuberculina (Cheng *et al*, 2005). Neste modelo, a inflamação pode ser observada no primeiro dia após a injeção intravítrea do antígeno da *Mycobacterium tuberculosis* através da morfologia e após o 4º dia, através da eletrofisiologia (Cheng *et al*, 1995; Jaffe *et al*, 1997; Chin *et al*, 2009).

Alguns trabalhos já utilizaram este modelo de UAE em coelhos para testar drogas como dexametasona, ciclosporina A e acetato de triancinolona liberadas através de implantes intravítreos. Dois grupos, Cheng e colaboradores, 1995 e Ghosn e colaboradores, 2011, estudaram os efeitos do implante de dexametasona (DEX) em coelhos. O primeiro grupo testou um implante com 5 mg de DEX em coelhos albinos, e o segundo com 700 µg em coelhos pigmentados, ambos acompanharam os efeitos através de exames clínicos, eletroretinograma (ERG) e histologia. Nos dois estudos, os resultados apontaram uma melhora na inflamação dos olhos tratados (Cheng *et al*, 1995; Ghosn *et al*, 2011).

Outros dois grupos, Jaffe e colaboradores, 1997 e Dong e colaboradores, 2006, estudaram os efeitos do implante intravítreo de ciclosporina A nos coelhos com UAE através da biomicroscopia, ERG e histologia. A diferença dos estudos está na concentração da droga e nos métodos, enquanto o primeiro grupo utilizou um implante com 5 mg de ciclosporina, o segundo grupo utilizou um implante com 2 mg do fármaco. Os resultados dos dois trabalhos mostraram que tanto a dose de 2 mg quanto a de 5 mg foram eficazes e diminuíram a inflamação causada pela uveíte (Jaffe *et al*, 1997; Dong *et al*, 2006).

Shin e colaboradores, 2009, estudaram o efeito terapêutico do implante intravítreo do acetato de triancinolona e utilizaram os mesmos métodos dos estudos citados anteriormente e também encontraram uma melhora na inflamação (Shin *et al*, 2009).

1.2. Micofenolato de mofetila

Geralmente, as drogas de primeira escolha para o tratamento das uveítes não infecciosas são os corticosteroides tópicos e sistêmicos. A terapia imunoreguladora é necessária em pacientes que não tiveram êxito com os primeiros ou que precisaram

suspender o uso de corticosteroides devido aos efeitos colaterais. 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 à suspensão da droga (Pato *et al*, 2011).

O micofenolato de mofetila (MMF) é um imunossupressor utilizado no tratamento de rejeição de órgãos transplantados (Warrens, 2000; Wiesner *et al*, 2001; Lake *et al*, 2005; Wiesner *et al*, 2006) e de doenças autoimunes como vasculites (Boumpas *et al*, 2000), lupus eritematoso sistêmico (Chan *et al*, 2000), psoríase (Zhou *et al*, 2003), artrite reumatóide (Goldblum, 1993), síndrome nefrótica (Schwarz, 2001) e vários tipos de uveítes não infecciosas (Kilmartin *et al*, 2001; Baltatzis *et al*, 2003; Daniel *et al*, 2009; Doycheva *et al*, 2011). Por ser uma pró-droga, após sua administração oral, o MMF é rapidamente convertido em ácido micofenólico (MPA), imunossupressor ativo e potente inibidor não competitivo da enzima chave da biossíntese de purinas, a inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), que inibe a replicação de DNA (Allison *et al*, 1993; Allison & Eugui, 1999).

Inibindo a IMPDH, o ácido micofenólico bloqueia a síntese de nucleotídeos de guanosina (GTP e dGTP), inibe a produção de anticorpos por linfócitos B e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição da migração de linfócitos citotóxicos e de monócitos nos tecidos inflamados (Morris *et al*, 1990; Grailer *et al*, 1991; Allison e Eugui, 2000).

Um estudo com pacientes, cujas uveítes moderadas a avançadas foram tratadas com MMF, mostrou redução na frequência das células T CD4+ e melhora da acuidade visual e opacidades vítreas (Kilmartin *et al*, 2001). Outro estudo avaliou 54 pacientes com uveíte crônica tratados com micofenolato de mofetil (via oral, 1 g duas vezes ao dia) e observou que a inflamação foi controlada em 65% dos pacientes e a acuidade visual foi mantida ou melhorada em 94%. No entanto, 44% dos participantes apresentou alguma reação adversa e 5% interrompeu o tratamento devido aos efeitos colaterais (Baltatzis *et al*, 2003).

Doycheva e colaboradores (2011) avaliaram a eficácia do MMF em longo prazo por via oral (1 g, duas vezes ao dia), em 60 pacientes com uveíte não infecciosa crônica e observaram que a inflamação foi controlada em 72% dos pacientes após 1 ano de tratamento e em 82%, após 2 anos. A acuidade visual foi estabilizada ou melhorada em 82% dos participantes e agravada em 18%. A interrupção do tratamento devido à melhora foi de 33% após cinco anos de terapia, porém, a reincidência da uveíte atingiu

29%. O tratamento foi ineficiente em 12 pacientes e os efeitos colaterais atingiram 17% dos pacientes.

Outro estudo, o qual acompanhou 236 pacientes desde o início do tratamento com MMF sistêmico, observou resultados positivos compatíveis com os estudos citados acima; assim como, observou que a interrupção do tratamento devido aos efeitos colaterais chegou a 12% (Daniel *et al*, 2010).

Portanto, estudos com MMF apontam que a droga é eficaz para estabilizar ou reduzir a inflamação ocular não infecciosa, melhorando a acuidade visual e permitindo a diminuição da dose de corticosteróides e outros imunossupressores também utilizados no tratamento. Por outro lado, como sua administração é realizada por via sistêmica e apenas uma pequena porção chega ao olho, muitos efeitos colaterais relacionados ao trato gastrointestinal (diarréia, náuseas e vômitos) e alterações hematológicas (anemia e leucopenia) são comumente decorrentes (Sollinger, 1995; Kilmartin *et al*, 1998; Larkin & Lightman, 1999; Kilmartin *et al*, 2001; Daniel *et al*, 2010; Doycheva, 2011).

Em animais, o primeiro estudo do uso de MMF em uveítes autoimune experimental foi realizado por Chanaud e colaboradores em 1995. Eles trataram ratos imunizados com antígeno-S da retina 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 (Chanaud *et al*, 1995).

Estudos que relacionam a droga ativa do MMF: o ácido micofenílico (MPA) e sua aplicabilidade em doenças oculares ainda são escassos. Dois trabalhos publicados pelo nosso grupo estudaram a toxicidade do MPA *in vitro* e *in vivo*. Zacharias e colaboradores avaliaram a toxicidade *in vitro* de três doses de MPA no epitélio pigmentado da retina e nas células de Müller. Os resultados indicaram alterações na viabilidade celular e um aumento na morte celular por apoptose na maior dose testada, 100 µg/mL (Zacharias *et al*, 2013).

Gasparin e colaboradores estudaram a farmacocinética e testaram a toxicidade de quatro doses da injeção intravítrea de MPA em coelhos sadios através da eletrofisiologia e da morfologia da retina. Os autores demonstraram que a meia vida da droga no vítreo do animal é de $5,0 \pm 0,3$ dias e que doses iguais ou maiores do que 0,05 µg diminuem a sensibilidade dos fotorreceptores (Gasparin *et al*, 2014).

1.3. Implante intravítreo biodegradável

Uma importante limitação dos tratamentos de doenças oculares é a penetração da droga no segmento posterior do olho. Em vista disso, vários métodos estão sendo estudados e aprimorados para se tornarem uma alternativa às administrações tópicas, sistêmicas e às injeções intravítreas (Short, 2008), cujos fatores negativos estão listados abaixo:

- a) *Colírios*: mesmo sendo os mais utilizados, possuem uma bioviabilidade menor do que 5% e são utilizados apenas em doenças do segmento anterior do olho (Fialho *et al*, 2003; Silva *et al*, 2010).
- b) *Administração sistêmica*: possui uma penetração baixa e necessita de concentrações elevadas durante um período prolongado. Além disso, expõe outros tecidos e órgãos sadios à droga (Fialho *et al*, 2003; Silva *et al*, 2010).
- c) *Injeções intraoculares*: por um lado, atingem diretamente o órgão alvo; por outro, possuem uma meia-vida reduzida, às vezes, tornando necessárias injeções repetidas (Fialho *et al*, 2003; Silva *et al*, 2010).

Os implantes intravítreos são estudados como uma alternativa às vias descritas acima por serem sistemas de liberação controlada e prolongada, capazes de manter a concentração e a liberação da droga no olho, reduzindo a toxicidade sistêmica e intraocular. Estes dispositivos podem ser desenvolvidos a partir de polímeros biodegradáveis ou não.

Enquanto os implantes não biodegradáveis necessitam de remoção através de procedimentos cirúrgicos, os implantes biodegradáveis (que serão testados neste trabalho) não necessitam de remoção por serem biocompatíveis com o organismo, quimicamente inertes, não-carcinogênicos, hipoalergênicos, mecanicamente estáveis e não causadores de resposta inflamatória no local de aplicação (Fialho & Cunha, 2007). Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli (ϵ -caprolactona), o poli (ácido láctico) (PLA) e o copolímero ácido láctico / ácido glicólico (PLGA), sendo que os dois últimos têm sido amplamente empregados (Fialho, 2003).

Diversos estudos clínicos e experimentais demonstraram que esteróides e imunossupressores administrados através de implantes intraoculares em olhos com uveíte mostraram melhora morfológica e funcional significativa da inflamação causada pela doença. Jaffe e colaboradores verificaram uma melhora no quadro da doença em

pacientes tratados com um implante intraocular de fluocinolona (Jaffe *et al*, 2000) e Gilger e colaboradores registraram melhoras no tratamento da uveíte após testarem implantes intravítreos de acetato de viniletileno contendo ciclosporina A (Gilger *et al*, 2000).

Outro estudo de Jaffe avaliou a eficácia e segurança do implante intraocular de acetato de fluocinolona (Retisert®) para o tratamento de uveítes posteriores não infecciosas e os efeitos indesejáveis como catarata e aumento da pressão intraocular apresentaram-se inferiores quando comparados com a administração sistêmica de formulação contendo o fármaco (Jaffe *et al*, 2006). Dong e colaboradores mostraram a possibilidade de tratamento da uveíte posterior em coelhos a partir de implantes intraoculares constituídos do polímero sintético ácido láctico-glicólico-copolicaprolactona contendo ciclosporina A (Dong *et al*, 2006).

1.4. Eletrorretinograma

O eletrorretinograma (ERG) é um registro da resposta elétrica da retina a um estímulo luminoso e pode ser realizado de maneira não invasiva por meio do registro da diferença de potencial entre um eletrodo posicionado na córnea e um eletrodo de referência. Estes sinais elétricos podem variar conforme a adaptação do sistema visual, as características temporais, espectrais e de luminância da luz (Perlman, 1995).

Alguns componentes da onda eletrorretinográfica são analisados através das medições das amplitudes e latências. Os diferentes componentes originam-se ou são afetados pela atividade de fotorreceptores, células bipolares e demais neurônios da retina, bem como de células da glia e células do epitélio pigmentar. A Figura 1 mostra o registro realizado em nosso laboratório da resposta escotópica máxima de um coelho albino evidenciando medições das onda-*a* e -*b*.

A onda-*a* corresponde à hiperpolarização de cones e bastonetes e a onda-*b*, anteriormente atribuída à despolarização das células de Müller, ocasionada pelo aumento da concentração de potássio na retina interna, é atribuída mais recentemente à ativação das células bipolares ON (Perlman, 1995; Wachtmeister, 1998).

Figura 1. A) Em azul, representação das correntes extracelulares formadas quando ocorre uma estimulação luminosa, trajetória A representa a corrente local dentro da retina e trajetória B mostra as correntes que saem da retina através do vítreo e da córnea e retornam à retina através da coróide e do epitélio pigmentar. O registro do eletroretinograma se dá pela trajetória B (fonte: webvision.med.utah.edu). B) Resposta escotópica máxima de um coelho albino (New Zealand) e marcações das amplitudes e tempos implícitos: (aa) amplitude da onda-a, (la) tempo implícito da onda-a, (ab) amplitude da onda-b e (lb) tempo implícito da onda-b.

Outros componentes do ERG também podem ser analisados: a onda-c é uma onda positiva lenta, gerada pelo epitélio pigmentar como consequência de sua interação com os bastonetes (Malmivuo & Plonsey, 1995) e os potenciais oscilatórios (POs) são ondas de pequena amplitude presentes na fase ascendente da onda-b e representam a atividade da retina interna (células bipolares, amácrinas e ganglionares). Apesar de refletirem a atividade da retina interna, ainda não se chegou a um consenso quais POs originam-se de vias de cones e quais POs originam-se de bastonetes (Wachtmeister, 1998; Dong *et al*, 2004; Lei *et al*, 2006).

Figura 2. As células da retina e suas respostas a um flash de luz. Os fotorreceptores provocam um potencial receptor negativo; as células bipolares despolarizam ou hiperpolarizam; a célula amácrina tem um efeito de retroalimentação negativa e o potencial de ação é disparado pelas gaanglionares. Fonte (Malmivuo & Plonsey, 1995).

Para facilitar a comparação da eletrorretinografia em diferentes laboratórios e clínicas, a Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV) padronizou um protocolo básico que visa avaliar as seguintes respostas: escotópica de bastonetes, escotópica máxima, escotópica de potenciais oscilatórios, fotópica de cones ao flash único e fotópica de flicker (Marmor *et al*, 2009). Os laboratórios que realizam ERGs em animais também se baseiam neste protocolo clínico.

Alguns exemplos de estudos realizados em nosso laboratório ilustram a importância do eletrorretinograma como uma ferramenta que avalia a integridade funcional da retina em algumas intoxicações e doenças humanas: intoxicação mercurial (Ventura *et al*, 2004), diabetes tipo 2 (Gualtieri, 2004; Gualtieri, 2009), Distrofia muscular de Duchenne (Costa, 2004), glaucoma (Barboni *et al*, 2010). E em modelos animais: camundongos com mutação no receptor do hormônio tireóideo (gene (TR)- β) e camundongos modelos de Alzheimer (Ioshimoto, 2010).

Testes eletrofisiológicos não são comumente requeridos para avaliação da uveíte, porém, em alguns casos, podem ser úteis para contribuir com a avaliação da severidade e expansão de danos causados pela doença, sua evolução e resultados de tratamentos.

Moschos e colaboradores realizaram uma revisão da literatura para demonstrar a importância dos exames eletrofisiológicos na uveíte humana e demonstraram que diferentes uveítes possuem registros eletrorretinográficos característicos de cada inflamação, por exemplo: 3% dos casos de uveíte são causadas pela Ciclite heterocrômica de Fuchs, neste caso, a inflamação atinge principalmente a parte anterior do olho, provocando redução na amplitude e aumento no tempo implícito da onda-*b*, assim como, redução nos potenciais oscilatórios e nas amplitudes das respostas a 30 Hz. No caso da uveíte intermediária, as alterações do ERG consistiram no aumento do tempo implícito da onda-*b*, diminuição da resposta de flicker 30 Hz e redução dos potenciais oscilatórios (Moschos *et al*, 2014).

Em ratos modelos de uveíte posterior experimental induzidos pelo antígeno-S, mesmo antes da inflamação ser detectada pelos exames clínicos e histológicos, o ERG apresentou-se supernormal após a terceira semana de indução e, após 21 dias da observação dos sinais clínicos da inflamação, o ERG tornou-se subnormal, recuperando-se na maioria dos casos (Stanford e Robbins, 1988).

No coelho modelo de UAE induzido pela *M. tuberculosis*, Cheng e colaboradores avaliaram a eletrofisiologia da retina após 14 dias da primeira injeção

intravítrea de tuberculina e após 4, 14, 28 e 80 dias após a segunda injeção intravítrea. Os autores avaliaram apenas as ondas-*b* dos estímulos escotópicos e fotópicos, mostrando apenas a razão entre a resposta dos olhos com UAE e dos olhos com UAE tratados com implantes intravítreos de dexametasona. Em seus resultados, os autores mostraram a melhora das respostas dos olhos tratados, porém, não descreveram quais intensidades foram utilizadas em cada estímulo (Cheng *et al*, 1995).

Outros estudos também utilizaram o ERG como ferramenta para avaliar a toxicidade de drogas intraoculares como o implante intravítreo de dexametasona (Ghosn *et al*, 2011), o implante intravítreo de ciclosporina A (Jaffe *et al*, 1997; Dong *et al*, 2006) e o implante intravítreo do acetato de triancinolona (Shin *et al*, 2009). Porém, todos os estudos avaliaram a toxicidade retiniana através da análise da onda-*b* escotópica em apenas uma intensidade escotópica e a avaliação do efeito terapêutico foi realizada em duas sessões de ERGs.

2. OBJETIVOS GERAIS

A) Determinar a taxa de liberação do ácido micofenólico (MPA) no vítreo de coelhos sadios ao longo de 42 dias após a introdução intravítrea de implantes biodegradáveis 200 µg.

B) Acompanhar a função retiniana ao longo de 50 dias após a introdução do implante de MPA em coelhos sadios e avaliar possíveis alterações fisiológicas e morfológicas retinianas causadas pelo implante de MPA.

D) Reproduzir o modelo de uveíte autoimune experimental (UAE) em coelhos induzidos pela injeção intravítrea de *M. tuberculosis* e acompanhar as alterações clínicas, eletrofisiológicas e morfológicas da retina causadas pela inflamação ocular.

E) Avaliar os efeitos terapêuticos do implante intravítreo de MPA em coelhos modelos de UAE através das análises clínicas, eletrofisiológicas e morfológicas da retina.

Capítulo 1

***Estudo eletrofisiológico, morfológico e farmacológico do
implante biodegradável de ácido micofenólico em coelhos
sadios***

1. OBJETIVOS

Neste primeiro capítulo, após a introdução de implantes biodegradáveis de ácido micofenólico (MPA) no vítreo de coelhos saudáveis, os objetivos foram: determinar a taxa de liberação da droga através da análise da cromatografia líquida de alta eficiência, avaliar possíveis alterações retinianas causadas pelo implante intravítreo de MPA através de eletrorretinogramas seriados nos 50 dias após a introdução do implante e, após 50º dia, analisar a morfologia da retina através da microscopia de luz e imunomarcagem da proteína ácida fibrilar glial.

2. MÉTODOS

2.1. Animais

Nesta primeira etapa do estudo, cinquenta e dois coelhos albinos da raça New Zealand (*Oryctolagus cuniculum*) pesando aproximadamente 2,5 kg foram divididos em dois grupos: 36 animais foram utilizados no estudo farmacológico e 16, nos estudos eletrofisiológicos e morfológicos.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da USP, com ciclo claro/escuro de 12 h/12 h, passaram por um período de adaptação ambiental durante três dias antes dos experimentos serem iniciados e 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).

Este projeto foi aprovado e registrado sob o número 001.2013 pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) do Instituto de Psicologia da USP (anexo A).

2.2. Implante biodegradável intravítreo de MPA

O desenvolvimento e a caracterização dos implantes biodegradáveis intravítreos de MPA foi um trabalho apresentado como parte da tese de doutorado do Dr. Ricardo Martins Duarte Byrro, sob orientação do Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti e co-orientação do Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Byrro, 2013).

Os métodos do desenvolvimento dos dispositivos intravítreos foram baseados no trabalho de Fialho e colaboradores e foram produzidos com as seguintes características: 6 mm de comprimento; 0,50 mm de diâmetro e 10% de fármaco (ácido micofenólico) foi incorporado aos implantes (Fialho *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3. Fotografias do implante desenvolvido.

Após passarem por uma análise de qualidade, os implantes intravítreos de MPA foram enviados ao nosso laboratório, onde foram realizados os exames clínicos, eletrofisiológicos e morfológicos.

A implantação dos dispositivos foi realizada com os animais sedados e anestesiados através da injeção intramuscular de 6,7 mg/kg de cloridrato de xilasina 2% (Calmium®; Agener, São Paulo, Brasil) e 50 mg/kg de cloridrato de ketamina 10% (Ketamina®; Agener, São Paulo, Brasil). Antes do procedimento cirúrgico, foi instilado o colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®; Alcon, São Paulo, Brasil) e iodopovidona 5% (Ophthalmos; São Paulo, Brasil) para a antisepsia.

A introdução do implante intravítreo de MPA foi realizada cirurgicamente pelo Dr. Leandro Zacharias, com auxílio de uma cânula transescleral de 23 Ga, próximo ao músculo reto e superior a 2,5 mm do limbo. No olho direito, o implante com MPA 200 µg foi direcionado ao quadrante temporal superior e no olho esquerdo, o implante controle, sem MPA, foi direcionado ao quadrante nasal superior dos 52 coelhos.

Figura 4. . Introdução do implante biodegradável em um coelho New Zealand anestesiado. Foto cedida pelo Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior (UFMG).

2.3. Estudo da farmacocinética dos implantes de MPA

Para garantir um poder de teste adequado, a proposta inicial foi realizar o experimento com no mínimo 24 coelhos divididos em seis grupos contendo quatro animais cada para determinar a liberação da droga no vítreo ao longo de 42 dias, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Assim, cada grupo foi sacrificado no 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias após introduzirmos os implantes. Porém, ao realizarmos a primeira análise dos resultados, foi necessário adicionarmos mais doze coelhos, que foram divididos em três pontos: 1º, 25º e 31º dias após a implantação. Abaixo, o esquema das coletas de amostras do estudo da farmacocinética (Figura 5).

Figura 5. Cronograma das coletas de amostras para o estudo farmacológico. Ao longo de 42 dias, quatro animais foram sacrificados em cada dia acima para a coleta de vítreo e implante para a quantificação de liberação de MPA.

Sob sedação profunda, os animais foram sacrificados através da injeção intracardiaca de 70 mg/kg de pentobarbital sódico (Euthanyle®; Brouwer, Buenos Aires, Argentina). Os olhos foram enucleados, os vítreos e implantes de ambos os olhos foram coletados e enviados para o grupo da UFMG, que analisou a farmacocinética através do protocolo da CLAE (Bahrami e Bahareh, 2006) que segue abaixo:

- Fase móvel: metanol e tampão fosfato 0,05 mol/L (46:54) contendo brometo de hexadecil trimetilamônio (100mg/L) e trietilamina (0,25% v/v), pH = 2,5 ajustado com H₃PO₄
- Fluxo da fase móvel: 2,2 mL/min
- Detecção: 210 nm
- Temperatura da coluna: 62o C
- Coluna: octadecilsilano (5 µm, 150 x 4,6 mm d.i.)
- Pré-coluna (5 µm, 1,0 cm x 4,6 mm d.i.)

Em uma primeira etapa, foram avaliadas as condições experimentais acima descritas e, em uma segunda etapa, foram realizados experimentos para validação do

método considerando-se os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, de acordo com a Resolução 899 de 9/05/2003 do Ministério da Saúde.

2.4. Eletrofisiologia

O estudo eletrofisiológico foi realizado através do eletrorretinograma (ERG). A primeira sessão do ERG foi realizada antes da introdução do implante e considerada a sessão controle das sessões posteriores à implantação. Uma semana depois, após serem sedados e anestesiados, os dezesseis animais receberam os implantes intravítreos biodegradáveis com MPA (200 µg) nos olhos direitos e os implantes intravítreos biodegradáveis sem MPA nos olhos esquerdos. As sessões seguintes foram realizadas após 10, 20, 30, 40 e 50 dias da introdução dos implantes e, no final da última sessão, sob anestesia profunda, os animais foram sacrificados, os olhos enucleados e o corpo vítreo foi coletado para a realização dos estudos morfológicos (Figura 6).

Figura 6. Esquema do estudo eletrofisiológico

Antes da realização do ERG, os animais foram sedados através da injeção intramuscular de 6,7 mg/kg de cloridrato de xilasina 2% (Calmium®; Agener, São Paulo, Brasil) e 50 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Ketamina®; Agener, São Paulo, Brasil); o colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®; Alcon, São Paulo, Brasil) foi instilado nos olhos, assim como o colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®; Alcon, São Paulo, Brasil) e o dilatador, tropicamida 1% (Mydriacyl®; Alcon, São Paulo, Brasil).

As respostas do ERG foram registradas binocularmente por eletrodos bipolares do tipo lente de contato (Goldlens; Doran Instruments Inc., Littleton, MA) sobre a córnea, que estava protegida com metilcelulose a 1% (Ophthalmos, SP). O eletrodo terra (modelo E5; Technologies Grass, West Warwick, RI) foi posicionado na orelha do animal e estabilizado com uma pasta condutora (Ten20, Weavy and Company, EUA), após o local ser limpo com álcool para retirar o excesso de oleosidade.

O sinal foi adquirido através do pré-amplificador e digitalizado por uma placa A/D (Roland Consult, Brandenburg, Alemanha), a frequência de corte baixa foi fixada em 1 Hz e a alta, em 300 Hz. Os dados foram transferidos para o Excel e analisados no Matlab para obtenção das médias de cada grupo. A análise estatística foi feita no programa SPSS, onde foi verificada a normalidade dos dados, e uma vez que os dados não são normais, foi utilizado o Teste de Wilcoxon pareado para amostras dependentes juntamente com a correção de Bonferroni.

Figura 7. Coelho albino New Zealand sedado e anestesiado com os eletrodos do ERG posicionados.

O protocolo do ERG utilizou os seguintes estímulos:

- 1) Escotópicos:** a) foram emitidos 10 flashes de $0,00095 \text{ cd.s/m}^2$ com intervalos entre flashes (IEF) de 5 s; b) após 10 s de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de $0,0095 \text{ cd.s/m}^2$ com IEF de 5 s; c) após 20 s de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de $0,095 \text{ cd.s/m}^2$ com IEF de 10 s; d) após 1 min de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de $0,95 \text{ cd.s/m}^2$ com um IEF de 10 s.
- 2) Escotópico máximo:** após 1 min de adaptação ao escuro, foram emitidos 3 flashes de $9,5 \text{ cd.s/m}^2$ com um IEF de 15 s.
- 3) Fotópico:** após 2 min de adaptação à luz de fundo de 25 cd/m^2 (luz branca); foram emitidos 6 flashes de $9,5 \text{ cd.s/m}^2$ com um IEF de 5 s.

4) Flicker: sob uma luz de fundo de 25 cd/m² (luz branca); foram emitidos 15 flashes de 9,5 cd.s/m² em quatro frequências: 12, 18, 24 e 30 Hz.

As análises foram realizadas a partir dos componentes das ondas-*a* e -*b* do ERG nas cinco diferentes intensidades e quatro frequências. A amplitude da onda-*a* foi medida a partir da linha de base até o pico negativo da onda e seu tempo implícito, medido a partir do início do estímulo luminoso até o pico da onda-*a*. A amplitude da onda-*b* foi medida a partir do pico da onda-*a* até o pico da onda-*b* e o tempo implícito da onda-*b*, a partir do estímulo luminoso até o pico da onda-*b*.

Também foram analisadas as amplitudes da onda-*b* em resposta às cinco intensidades através da equação de Naka-Rushton: $V = V_{max} \frac{I^n}{k^n + I^n}$, onde **V_{max}** é a amplitude saturada da onda-*b*, **I** é a intensidade de luz, **k** é a intensidade necessária para alcançar 50% de V_{max} e **n** é a inclinação da função, representando o arranjo da dinâmica das medidas da onda e a sensibilidade da função retiniana.

2.5. Morfologia

Para os estudos morfológicos, cortes histológicos das retinas foram analisados por microscopia de luz e imuno-histoquímica.

Após a última sessão de ERG e antes do final dos efeitos da anestesia, os coelhos foram sacrificados com injeção intracardíaca de 70 mg/kg de pentobarbital sódico (Euthanyle®; Brouwer, Buenos Aires, Argentina) e em seguida foi realizada a enucleação bilateral dos globos oculares. Os globos oculares foram fixados em solução de paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em tampão fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4, por 30 minutos. Em seguida, os segmentos anteriores dos globos oculares, contendo córnea, íris e cristalino, foram cuidadosamente removidos através de incisão circular límbica, obtendo-se assim a cuia óptica, com a retina. As cuias ópticas foram então pós-fixadas em PFA 4% por 3,5 horas a 4° C, e em seguida crioprotetidas com concentrações crescentes de soluções de sacarose (10, 20 e 30%), diluídas em PB 0,1 M pH 7,4 até que o material fosse totalmente submerso na solução. Após as etapas de crioproteção, as cuias ópticas foram emblocadas com Tissue Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Torrence, CA), em gelo seco e mantidas a -70° C.

Cortes radiais das retinas com 12 µm de espessura foram feitos a -24° C em 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 USP, chefiado pela Profa Dra. Dânia Emi Hamassaki. Os cortes foram colocados sobre lâminas histológicas previamente gelatinizadas, secos em placa aquecedora a 37° C por 1 hora e, posteriormente, congelados a -20°C em caixas para lâminas, até o momento de uso.

2.5.1. Análises Histopatológicas das Retinas

Para as análises histopatológicas das retinas, os cortes obtidos em criostato tanto do olho direito como do olho contralateral foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), através das seguintes etapas:

1. Água destilada - 2 segundos
2. Hematoxilina - 1 a 2 minutos
3. Água destilada - 2 minutos
4. Eosina - 30 segundos
5. Álcool 95% - 2 segundos
6. Álcool 95% - 1 minuto
7. Álcool 100% - 1 minuto
8. Álcool 100% - 1 minuto
9. Álcool/Xilol (1:1) - 1 minuto
10. Xilol I - 2 minutos
11. Xilol II - 2 a 3 minutos

As lâminas foram montadas com DPX e lamínula e observadas em microscópio de luz (Leica DMRXE).

2.5.2. Imuno-histoquímica para identificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para identificar a presença da proteína proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um filamento intermediário presente em células da neuroglia cujo aumento de sua expressão é um marcador de gliose das células de Müller.

Os cortes radiais das retinas foram primeiramente lavados tampão fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4, com Triton X-100 a 0,3% (3 lavagens de 10 minutos cada), e em seguida 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. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário contra GFAP, anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra a proteína ácida fibrilar glial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 1:1000 em PB 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, por aproximadamente dezesseis horas em temperatura ambiente. Após lavagens com PB 0,1 M pH 7,4, com Triton X-100 a 0,3% (3 lavagens de 10 minutos cada), o material foi incubado com anticorpo secundário CY3 (1:200, SIGMA). As lâminas foram montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield (Vector Laboratories Inc, California, USA) com DAPI, marcador fluorescente que se liga fortemente às regiões ricas em adenina e timina em sequências de DNA, marcando os núcleos celulares. Os tecidos foram analisados em microscópio de fluorescência (Leica DMRXE) com objetiva de 40x oil (NA = 0.7) ou de 100x oil (abertura numérica, NA = 1.25), com um conjunto de filtros específicos para CY3 (excitação verde, emissão vermelho), e para DAPI (excitação UV, emissão azul).

3. RESULTADOS

3.1. Estudo farmacocinético

A análise do perfil farmacocinético demonstrado pela Figura 8 indica que o implante foi capaz de liberar MPA numa taxa constante até o 21º dia, período no qual a concentração de MPA no vítreo foi próxima de 100 ng/mL. No 28º dia, foi observada uma variação no perfil da liberação devido à ocorrência de um pico (*burst*) de liberação seguido do decaimento da quantidade de liberação de MPA pelo implante.

Figura 8. Gráfico da quantificação da liberação pontual diária do implante de MPA de 200 µg no vítreo dos coelhos, barras verticais representam o desvio padrão (n=4).

A concentração máxima (C_{max}) e o tempo máximo (T_{max}) do MPA foram determinados diretamente a partir dos dados do gráfico da Figura 8. A área sob a curva do tempo zero ao tempo final (ASC_{0-t}) foi calculada com os dados obtidos durante os 42 dias utilizando-se a regra linear trapezoidal. A constante de eliminação (K_{el}) foi calculada por regressão linear das concentrações logarítmicas dos últimos sete dias e o tempo de meia vida ($T_{1/2}$) foi calculado com base na K_{el} . Para os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, utilizou-se os programas Excel (Microsoft) e MiniTab (MiniTab Inc) e os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros farmacocinéticos do implante de MPA.

Parâmetros farmacocinéticos	Resultados
$C_{\max}$	529,20 ng/mL
$T_{\max}$	24,5 dias
Kel	0,1754 dia
$T_{1/2}$	3,95 dias

$C_{\max}$ =concentração máxima, $T_{\max}$ = tempo máximo, Kel= constante de eliminação e $T_{1/2}$ = tempo de meia vida

Os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência não detectaram MPA nos olhos contralaterais.

3.2. Estudo eletrofisiológico

Abaixo, a Figura 9 representa as respostas escotópicas em cinco intensidades diferentes dos olhos com implantes de MPA (linha contínua) e dos olhos com implantes sem MPA (linha pontilhada) em três sessões de ERGs.

Figura 9. ERGs escotópicas obtidos em um mesmo animal (implante controle – traço pontilhado, implante com MPA, traço cheio) em cinco intensidades diferentes registradas em três sessões: antes da introdução dos implantes e após 20 e 50 dias.

A seguir, a Figura 10 mostra os valores médios dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* em resposta aos cinco estímulos escotópicos: 0,00095 (-3 log); 0,0095 (-2 log); 0,095 (-1 log); 0,95 (0 log) e 9,5 cd.s/m² (1 log) antes e após 20 e 30 dias da implantação. A análise estatística realizada com o Teste de Wilcoxon pareado não mostrou diferença entre os grupos *sem* MPA e *com* MPA ($p > 0,05$).

Figura 10. Médias dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* relacionadas às cinco intensidades: 0,00095; 0,0095; 0,095; 0,95 e 9,5 cd.s/m² (-3, -2, -1, 0 e 1 log consecutivamente) dos olhos com implantes *sem* MPA (linha pontilhada) e *com* MPA (linha contínua) registradas em três sessões: antes e após 20 e 30 dias da introdução dos implantes. Barras verticais = DP.

A análise realizada através da equação de Naka-Rushton, que permite a construção de uma função com as amplitudes da onda-*b* em resposta às cinco intensidades escotópicas, também não mostrou diferença entre os olhos com o implante *sem* MPA e *com* MPA. Abaixo, na Figura 10 podemos ver as funções dos dois grupos ao longo de 50 dias após a implantação.

Figura 11. Médias das amplitudes da onda- b antes e após implantação em função das cinco intensidades de acordo com a equação de Naka-Rushton. **A)** Médias do grupo dos olhos que receberam os implantes *sem* MPA. **B)** Médias do grupo dos olhos que receberam os implantes *com* MPA. Área cinza = DP da sessão pré-implantação.

A partir da equação de Naka-Rushton, obtivemos os parâmetros relacionados à amplitude saturada da onda-*b* (**V_{max}**), à intensidade necessária para alcançar 50% de V_{max} (**k**) e à inclinação da função (**n**). A Figura 12 mostra as médias dos parâmetros relacionados às curvas da Figura 11. A análise estatística realizada com Teste de Wilcoxon pareado não mostrou diferença ao compararmos os parâmetros dos dois grupos ($p > 0,05$).

Figura 12. Médias dos parâmetros calculadas através da equação de Naka-Rushton antes da implantação e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias. **A)** Média das amplitudes saturadas da onda-*b* (**V_{max}**). **B)** Média das intensidades necessárias para alcançar 50% de V_{max} (**k**) e **C)** à inclinação da função (**n**). Círculo aberto representa os olhos que receberam os implantes sem MPA e os fechados, implantes com MPA. Barras verticais = DP.

Abaixo, a Figura 13 representa as respostas fotópicas dos olhos com implantes *com* MPA (linha contínua) e dos olhos com implantes *sem* MPA (linha pontilhada) em três sessões de ERGs.

Figura 13. Respostas fotópicas de um mesmo animal registradas em três sessões: antes da introdução dos implantes e após 20 e 50 dias. As ondas pontilhadas representam as respostas do olho esquerdo com implante branco *sem* MPA e as ondas contínuas, do olho direito com implante *com* MPA.

Na Figura 14, podemos observar as médias dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* das respostas fotópicas antes da implantação e ao longo de 50 dias. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 14. Comparação das médias dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* das respostas fotópicas dos olhos com implantes *sem* MPA (círculo aberto) e *com* MPA (círculo fechado) registradas em seis sessões: antes e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias da introdução dos implantes. Barras verticais = DP. **A)** Média dos tempos implícitos da onda-*a*. **B)** Média das amplitudes da onda-*a*. **C)** Média dos tempos implícitos da onda-*b*. **D)** Médias das amplitudes da onda-*b*.

Abaixo, podemos observar a representação das respostas intermitentes (flicker) em quatro frequências: 12, 18, 24 e 30 Hz dos olhos com implantes *com* MPA (linha contínua) e *sem* MPA (linha pontilhada) em três sessões de ERGs (Figura 15).

Figura 15. Respostas intermitentes em quatro frequências diferentes (12, 18, 24 e 30 Hz) registradas em um mesmo animal durante três sessões: antes da introdução dos implantes e após 20 e 50 dias. As ondas pontilhadas representam as respostas do olho esquerdo com implante *sem* MPA e as ondas contínuas, do olho com implante *com* MPA.

O componente do 1º harmônico do flicker foi analisado através da Transformada de Fourier utilizando o programa Matlab (TheMathWorks, EUA). Na Figura 16, podemos observar a comparação das médias das amplitudes e das fases do 1º harmônico em resposta às frequências de 12, 18, 24 e 30 Hz entre os dois grupos. Nenhuma diferença estatística foi encontrada ao compararmos as dos dois grupos ($p > 0,05$).

Figura 16. Médias das amplitudes e fases calculadas a partir da Transformada de Fourier do 1º Harmônico das respostas às frequências de 12, 18, 24 e 30 Hz.

3.3. Análise morfológica: Microscopia de luz e Imuno-histoquímica

As retinas de todos os olhos que receberam implantes com e sem MPA não apresentaram alterações sob microscopia de luz. Conforme ilustrado na Figura 17, a arquitetura do tecido foi preservada e podemos observar coradas com hematoxilina a

camada nuclear externa (CNE), onde estão localizados os núcleos dos fotorreceptores; a camada nuclear interna (CNI), com os núcleos das células bipolares, amácrinas, horizontais e células de Müller e a camada de células ganglionares (CCG), constituída pelos núcleos destes neurônios. Coradas com eosina, podemos observar organizados verticalmente, acima da CNE, os segmentos externos dos fotorreceptores.

Na Figura 17, para compararmos os olhos implantados com um olho que não sofreu nenhum tipo de procedimento cirúrgico, incluímos o olho controle do grupo dos animais induzidos à uveíte autoimune experimental descrito no capítulo 2.

Figura 17. Cortes radiais da região central da retina de coelhos corados com H&E. **A)** Corte radial do olho que não passou por procedimentos cirúrgicos. **B)** Corte radial do olho com implante intravítreo *sem* MPA. **C)** Corte radial do olho com implante intravítreo *com* MPA. CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares. Aumento do microscópio óptico: 40x.

A análise imuno-histoquímica não detectou a presença da proteína GFAP em nenhuma amostra dos olhos que receberam implantes com e sem MPA.

Figura 18. Cortes radiais da retina de coelhos. **A)** Olho esquerdo que não passou por procedimento cirúrgico, marcado com DAPI e **B)** mesmo corte imuno-marcado com o anticorpo anti-GFAP. **C)** Olho implantado com dispositivo intravítreo *sem* MPA e marcado com DAPI e **D)** mesmo corte imuno-marcado com o anticorpo anti-GFAP. **E)** Olho implantado com dispositivo intravítreo *com* MPA e marcado com DAPI **F)** mesmo corte imuno-marcado com o anticorpo anti-GFAP. CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares. Aumento do microscópio de fluorescência: 40x.

4. DISCUSSÃO

Os resultados da cinética de liberação dos implantes *in vivo* demonstraram que os dispositivos atuam como agentes de liberação controlada por um período de 42 dias. A concentração máxima foi observada após 24,5 dias, quando houve o pico de liberação do MPA. Este fenômeno já foi descrito para sistemas de liberação de fármacos similares, construídos com o polímero PLGA (Kunol *et al*, 1995; Kunol *et al*, 2000; Yasukaway *et al*, 2001; Lee *et al*, 2010). Tal efeito pode ser explicado pelo intumescimento da matriz polimérica quando entra em contato com o vítreo e, à medida que o fármaco é liberado e a matriz é degradada pelo meio, há uma tendência do implante perder sua integridade física e se romper em porções menores. Com isso, aumenta a superfície de contato, originando uma maior liberação do fármaco.

Segundo as análises realizadas através das amplitudes e tempos implícitos das ondas-*a* e-*b* das respostas escotópicas e fotópicas, assim como as amplitudes e fases calculadas a partir da Transformada de Fourier do 1º Harmônico das respostas intermitentes em diferentes frequências, os resultados eletrofisiológicos mostraram que não houve alterações funcionais na retina ocasionadas pelos implantes intravítreos de PLGA contendo ácido micofenólico na dose de 200 µg. Estes resultados concordam com nossos achados morfológicos através da histologia e da imunomarcção da proteína GFAP, os quais mostraram que os implantes de MPA de 200 µg também não provocam lesões retinianas nos coelhos.

Portanto, a partir do perfil farmacocinético determinado nesta fase, que indica a permanência do MPA no vítreo do coelho por mais de 40 dias e dos perfis funcionais e morfológicos, os quais não detectaram alterações retinianas, nossos resultados indicam que o sistema de liberação controlado de MPA na dose de 200 µg pode ser uma alternativa às vias sistêmica e tópica para o tratamento de doenças oftalmológicas.

Capítulo 2
Análise eletrofisiológica e morfológica do coelho modelo de
uveíte autoimune experimental

1. OBJETIVOS

Neste capítulo, reproduzimos o modelo de uveíte autoimune experimental (UAE) em coelhos induzidos através da injeção intravítrea de *Mycobacterium tuberculosis* descrito por Cheng e colaboradores, 1995.

Após a indução da UAE, nosso objetivo foi acompanhar e avaliar o desenvolvimento da doença analisando os registros eletroretinográficos durante 50 dias após a indução da uveíte. Também foram realizados exames clínicos ao longo de 42 dias e, no final do experimento, analisamos a integridade da retina a partir da microscopia de luz e da imunomarcagem da proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

2. MÉTODOS

2.1 Animais

Doze coelhos albinos da raça New Zealand (*Oryctolagus cuniculum*) pesando aproximadamente 2,5 kg foram induzidos à uveíte autoimune experimental e utilizados nos estudos clínicos, eletrofisiológicos e morfológicos.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da USP, com ciclo claro/escuro de 12 h/12 h, passaram por um período de adaptação ambiental durante três dias antes dos experimentos serem iniciados.

2.2. Indução da uveíte autoimune experimental (UAE)

A indução da uveíte autoimune experimental nos coelhos foi baseada no protocolo descrito por Cheng e colaboradores, 1995 (Cheng *et al*, 1995).

Após o período de adaptação no biotério, os animais foram sedados e pré-imunizados com uma injeção subcutânea de 10 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco) suspenso em 0,5 ml de óleo mineral. Depois de 14 dias, os animais foram sedados e anestesiados através da injeção intramuscular de 6,7 mg/kg de cloridrato de xilasina 2% (Calmium®; Agener, São Paulo, Brasil) e 50 mg/kg de cloridrato de ketamina 10% (Ketamina®; Agener, São Paulo, Brasil). Após aplicação tópica de colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®; Alcon, São Paulo, Brasil) e iodopovidona 5% (Ophthalmos; São Paulo, Brasil) para a antisepsia, 25 µg de *M. tuberculosis* suspensos em 0,1 ml de solução salina foram injetada na cavidade vítrea dos olhos direitos dos coelhos, próximo ao músculo reto superior a 2,5 mm do limbo (1º dia da indução). Após duas semanas, outra injeção intravítrea de *M. tuberculosis* com a mesma dosagem foi realizada (14º dia da indução). As injeções intravítreas foram realizadas pelo Dr. Francisco Max Damico.

Deste modo, todos os animais foram pré-imunizados, mas, somente os olhos direitos foram induzidos à UAE com a injeção intravítrea do antígeno. Os olhos esquerdos não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento cirúrgico.

Figura 19. Esquema do cronograma para a indução da uveíte autoimune experimental em coelhos

2.3. Eletrofisiologia

O estudo eletrofisiológico foi realizado ao longo de cinquenta dias após a indução da UAE. A primeira sessão do ERG foi realizada antes da indução e considerada a sessão controle das sessões posteriores à inflamação. As sessões seguintes foram realizadas após 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a injeção intravítrea de *M. Tuberculosis*.

Figura 20. Esquema do cronograma dos estudos eletrofisiológicos.

Após serem sedados e anestesiados, foi instilado o colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®; Alcon, São Paulo, Brasil) e os animais foram submetidos ao seguinte protocolo:

1) Escotópicos: a) foram emitidos 10 flashes de $0,00095 \text{ cd.s/m}^2$ com intervalos entre flashes (IEF) de 5 s; b) após 10 s de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de $0,0095 \text{ cd.s/m}^2$ com IEF de 5 s; c) após 20 s de adaptação ao escuro, foram emitidos 6

flashes de 0,095 cd.s/m² com IEF de 10 s; d) após 1 min de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de 0,95 cd.s/m² com um IEF de 10 s.

2) Escotópico máximo: após 1 min de adaptação ao escuro, foram emitidos 3 flashes de 9,5 cd.s/m² com um IEF de 15 s.

3) Fotópico: após 2 min de adaptação à luz de fundo de 25 cd/m² (luz branca); foram emitidos 6 flashes de 9,5 cd.s/m² com um IEF de 5 s.

4) Flicker: sob uma luz de fundo de 25 cd/m² (luz branca); foram emitidos 15 flashes de 9,5 cd.s/m² em quatro frequências: 12, 18, 24 e 30 Hz.

A análise estatística foi feita no programa SPSS, onde foi verificada a normalidade dos dados, e uma vez que os dados não são normais, foi utilizado o Teste de Wilcoxon pareado para amostras dependentes juntamente com a correção de Bonferroni.

2.4. Morfologia

Para os estudos morfológicos, cortes histológicos das retinas foram marcados pela técnica de imuno-histoquímica e por coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E). Após a última sessão de ERG e antes do final dos efeitos da anestesia, os coelhos foram sacrificados e em seguida foi realizada a enucleação bilateral dos globos oculares, os quais foram fixados, crioprotetido e emblocado.

Cortes radiais das retinas com 12 µm de espessura foram feitos a -24° C em criostato e colocados sobre lâminas histológicas previamente gelatinizadas.

2.4.1. Análises Histopatológicas das Retinas

Para as análises histopatológicas das retinas, os cortes obtidos em criostato tanto do olho com uveíte autoimune experimental quanto do controle foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), através do mesmo protocolo descrito no capítulo 1.

As lâminas foram montadas com DPX e lamínula e observadas em microscópio de luz (Leica DMRXE).

2.4.2. Imuno-histoquímica para identificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário contra GFAP, anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra a proteína ácida fibrilar glial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 1:1000 em PB 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, por aproximadamente dezesseis horas em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi incubado com anticorpo secundário CY3 (1:200, SIGMA) e as lâminas foram montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield (Vector Laboratories Inc, California, USA) com DAPI. Os tecidos foram analisados em microscópio de fluorescência (Leica DMRXE) com objetiva de 40x oil (NA = 0.7) ou de 100x oil (abertura numérica, NA = 1.25), com um conjunto de filtros específicos para CY3 (excitação verde, emissão vermelho) e DAPI (excitação UV, emissão azul).

3. RESULTADOS

3.1. Estudo eletrofisiológico

Abaixo, a Figura 21 representa as respostas escotópicas em cinco intensidades diferentes dos olhos com UAE (linha contínua) e dos olhos controles (linha pontilhada) do mesmo coelho em três sessões de ERGs: antes da indução e após 20 e 50 dias.

Figura 21. ERGs escotópicos obtidos em um mesmo animal (olho controle – traço pontilhado; olho com UAE – traço cheio) em cinco intensidades diferentes registradas em três sessões: antes da indução da UAE e após 20 e 50 dias..

Na Figura 22, podemos comparar os valores médios dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* nos cinco estímulos escotópicos: 0,00095 (-3 log); 0,0095 (-2 log); 0,095 (-1 log); 0,95 (0 log) e 9,5 cd.s/m² (1 log) ao longo de 50 dias após a indução da UAE. A análise estatística realizada com o Teste de Wilcoxon pareado com correção de Bonferroni mostrou diferenças estatísticas significativas entre os grupos após 20, 30 e 40 dias da indução que serão descritas a seguir.

Figura 22. Médias dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-a e -b nos cinco estímulos escotópicos: 0,00095; 0,0095; 0,095 e 9,5 cd.s/m² (-3, -2, -1, 0 e 1 log consecutivamente) dos olhos controles (linha pontilhada) e com UAE (linha contínua) registrados em seis sessões: antes e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias da introdução dos implantes. Barras verticais = DP. * p<0,01 e ** p<0,001.

Nos gráficos da figura 22, ao observarmos as comparações das amplitudes e tempos implícitos em função das cinco intensidades, notamos que a onda-*a* do grupo com UAE mostrou-se mais lenta após 10 dias da indução para as intensidades -2 e -3 log ($p<0,01$ e $p<0,001$); após 20 dias, para as intensidades -1, 0 e 1 log ($p<0,001$, $p<0,001$ $p<0,01$); após 30 dias, para a intensidade de -1 log ($p<0,01$) e após 40 dias para a intensidade de 1 log ($p<0,01$).

As amplitudes da onda-*a* para o grupo com UAE apresentaram-se menores após 20 dias ($p<0,01$) e apenas as respostas escotópicas máximas apresentaram-se menores ($p<0,01$) após 30 e 40 dias da indução. Ao contrário da resposta da onda-*a*, a onda-*b* foi mais rápida para o grupo com UAE, principalmente, para as intensidades mais altas após 10 e 40 dias ($p<0,01$ e $p<0,001$) e as amplitudes da onda-*b* mostraram-se menores entre 20 e 40 dias para as intensidades mais altas. Após 50 dias da indução da UAE, as respostas escotópicas voltaram a se igualar com as respostas dos olhos controles após 50 dias da indução.

Na Figura 24, podemos observar a comparação entre os olhos controles e os olhos com UAE dos parâmetros obtidos através da equação de Naka-Rushton, relacionados à amplitude saturada da onda-*b* (**V_{max}**), à intensidade necessária para alcançar 50% de V_{max} (**k**) e à inclinação da função (**n**). A análise estatística mostrou que os valores de **k** para o grupo com UAE apresentam-se maiores nas sessões após 10 ($p<0,01$), 20 ($p<0,001$) e 30 dias ($p<0,01$) da indução, também podemos observar que este parâmetro manteve-se constante ao longo dos 50 dias.

Figura 23. Médias das amplitudes da onda- b antes e após a indução da UAE em função das cinco intensidades de acordo com a equação de Naka-Rushton. Área cinza representa o desvio padrão da sessão pré-indução. **A)** Médias do grupo dos olhos controles. **B)** Médias do grupo dos olhos com UAE.

Figura 24. Comparação entre as médias dos parâmetros calculadas através da equação de Naka-Rushton antes da indução da UAE e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias. A) Média das amplitudes saturadas da onda-b (**Vmax**). B) Média das intensidades necessárias para alcançar 50% de Vmax (**k**) e C) e à inclinação da função (**n**). Círculo aberto representa os olhos controles e os fechados, olhos com UAE. Barras verticais = DP. *p<0,01 e **p<0,001.

Abaixo, a Figura 25 apresenta as respostas fotópicas dos olhos com UAE (linha contínua) e dos olhos controles (linha pontilhada) em três sessões de ERGs.

Figura 25. Respostas fotópicas de um mesmo animal registradas em três sessões: antes da indução da UAE e após 20 e 50 dias. As ondas pontilhadas representam as respostas do olho controle e as ondas contínuas, do olho com UAE.

Na Figura 26, podemos observar as médias dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* das respostas fotópicas antes da indução e ao longo de 50 dias.

Figura 26. Médias dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* das respostas fotópicas dos olhos controles (círculo aberto) e com UAE (círculo fechado) registrados em seis sessões: antes e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias da indução da uveíte. **A)** Média dos tempos implícitos da onda-*a*. **B)** Média das amplitudes da onda-*a*. **C)** Média dos tempos implícitos da onda-*b*. **D)** Médias das amplitudes da onda-*b*. Barras verticais = DP. * $p<0,01$.

A análise estatística apontou diferença entre os olhos controles e os olhos com UAE para a onda-*a*, cujo tempo implícito foi maior para os olhos inflamados na sessão após 30 dias ($p<0,01$) e a amplitude apresentou-se maior em relação aos controles após 10 dias ($p<0,01$) e menor após 20 dias da indução ($p<0,01$). Com relação à onda-*b*, as respostas foram mais lentas entre 20 e 40 dias, enquanto o controle manteve-se constante ao longo de todo o experimento e a amplitude mostrou-se menor somente após 20 dias ($p<0,01$).

A seguir, podemos observar as respostas intermitentes em quatro frequências diferentes: 12, 18, 24 e 30 Hz dos olhos com UAE (linha contínua) e dos olhos controles (linha pontilhada) em três sessões de ERGs (Figura 27).

Figura 27. Respostas intermitentes em quatro frequências diferentes (12, 18, 24 e 30 Hz), registradas em um mesmo animal, em três sessões: antes da indução da UAE e após 20 e 50 dias. As ondas pontilhadas representam as respostas do olho controle e as ondas contínuas, do olho com UAE.

O 1º harmônico do flicker foi analisado através da Transformada de Fourier utilizando o programa Matlab (TheMathWorks, EUA). Na figura 28, podemos observar a comparação das médias das amplitudes e das fases em resposta às frequências de 12, 18, 24 e 30 Hz.

Figura 28. Comparação entre o grupo *com* UAE e seu controle das médias das amplitudes e fases calculadas a partir da Transformada de Fourier do 1º Harmônico das respostas às frequências de 12, 18, 24 e 30 Hz.

A análise estatística indicou que as fases das respostas registradas a 12 Hz foram menores para o grupo com UAE após 10 e 30 dias da indução ($p < 0,01$) e, após 20 dias, as fases do grupo com UAE mostraram-se maiores ($p < 0,01$). Para a frequência de 18 Hz, as amplitudes dos olhos com UAE apresentaram-se maiores após 30 dias da indução ($p < 0,01$) e as fases para o mesmo grupo apresentaram-se menores entre 10 e 30 dias

após a indução ($p<0,01$), enquanto que as fases do grupo controle para as frequências de 18, 24 e 30 Hz mostraram-se constantes desde a primeira sessão de ERG.

3.2. Biomicroscopia

A avaliação clínica através da biomicroscopia revelou que a conjuntiva apresentou hiperemia leve (1+) na 1ª semana e diminuiu progressivamente até o 35º dia.

A presença de células na câmara anterior foi muito intensa a partir da 1ª semana (3+), mas diminuiu progressivamente. No 42º dia, ainda era considerada leve (1+). A presença de flare na câmara anterior foi considerada moderada (2+) nos primeiros 21 dias, e tornou-se leve (1+) a partir de então.

Não foram encontrados neovasos na íris ao longo de todo o experimento assim como a córnea não apresentou alterações, mantendo-se lisa, brilhante e transparente desde o início. Quase todos os olhos com UAE desenvolveram cataratas relacionadas à inflamação.

O exame clínico sugere que a UAE consiste numa uveíte anterior, pois a avaliação fundoscópica não mostrou células no corpo vítreo, descolamento de retina, sinais de comprometimento anatômico da retina de forma irreversível ou grave e nenhuma alteração foi encontrada nos olhos contralaterais. Os resultados dos exames biomicroscópicos realizados nos coelhos ao longo do desenvolvimento da uveíte podem ser observados na Figura 29.

Figura 29. Avaliação clínica dos olhos com uveíte autoimune experimental

3.3. Análise morfológica: Microscopia de luz e Imuno-histoquímica

A microscopia de luz de todos os olhos não evidenciou sinais de dano retiniano nos olhos controles e nos olhos com uveíte autoimune experimental. A Figura 30 mostra preservação do tecido retiniano, sem alteração nas camadas nuclear externa (CNE), nuclear interna (CNI) e na camada de células ganglionares (CCG).

Figura 30. Cortes radiais da região central da retina de coelhos corados com H&E. **A)** Corte radial do olho controle. **B)** Corte radial do olho com uveíte autoimune experimental. CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares. Aumento do microscópio óptico: 40x.

Apesar da microscopia de luz não indicar danos, a imuno-histoquímica detectou a presença da proteína GFAP (Glial fibrillary acidic protein) nas células de Müller nos cortes dos olhos com UAE (Figura 31).

Figura 31. A) Corte radial da retina do olho controle marcado com DAPI, B) mesmo corte imuno-marcado com o anticorpo anti-GFAP e C) sobreposição das imagens A e B. D) Corte radial da retina do olho com UAE marcado com DAPI, E) mesmo corte imuno-marcado com o anticorpo anti-GFAP e F) sobreposição das imagens D e E . CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares. Aumento do microscópio de fluorescência: 40x.

4. DISCUSSÃO

O modelo descrito por Cheng e colaboradores (1995) foi reproduzido com sucesso em nosso laboratório e os resultados do grupo com uveíte mostraram-se homogêneos e viáveis para os estudos terapêuticos experimentais que serão apresentados no próximo capítulo deste trabalho. Os resultados clínicos e funcionais apontaram uma recuperação da doença ao longo do tempo, entretanto, os resultados imuno-histoquímicos apontaram sinais de inflamações após 50 dias da indução da uveíte. A seguir, comentaremos os três conjuntos de forma detalhada.

A partir do 3º dia de indução, os exames clínicos mostraram que a uveíte induzida com *M. tuberculosis* afeta a parte anterior do olho e que a intensidade da inflamação diminui com o tempo. Nossos resultados indicam que a hiperemia conjuntival só desaparece após a completa regressão da inflamação intraocular. Todavia, as biomicroscopias e os exames de fundo do olho revelaram que, ao mesmo tempo que ocorre uma diminuição do flare e das células encontradas na câmara anterior, aproximadamente no 28º dia, o número de animais com catarata subcapsular chega a 83%. É comum o surgimento da catarata após o episódio inicial de uveíte e esta opacidade do meio pode ser causada pelas alterações bioquímicas do cristalino que ocorrem durante a inflamação.

Em humanos, o efeito da atenuação causada pela opacidade no meio óptico pode variar o equivalente a 0 e 3 log de unidades no filtro de densidade neutra e, como consequência, pode provocar tanto respostas subnormais como supernormais de ERG. No primeiro caso, a diminuição das amplitudes é justificada pela atenuação da intensidade luminosa dos estímulos do ERG, que são filtrados pela lente opaca; no caso alternativo, o aumento das amplitudes encontrado em humanos com cataratas é justificado pela dispersão da luz (Galloway, 1988; Ratanapakorn *et al*, 2010).

Contudo, em nossos resultados com coelhos modelos de UAE, podemos sugerir que as alterações encontradas na eletrorretinografia não são consequências da catarata, uma vez que esta opacidade do cristalino é irreversível e as alterações encontradas nos ERGs foram registradas apenas entre os 10º e 40º dias após a indução da UAE. A catarata também foi reportada por Cheng e colaboradores após induzirem a uveíte autoimune experimental em coelhos através da injeção intravítrea de *M. tuberculosis*,

seus resultados apontaram que 70% dos coelhos desenvolveram a opacidade do cristalino (Cheng *et al*, 1995).

Nosso trabalho é o primeiro a descrever com mais detalhes a eletrofisiologia da retina dos coelhos modelos de UAE induzidos pela *M. tuberculosis* e os resultados indicam que durante o período crítico de inflamação apontado pelos exames clínicos (entre 14 e 28 dias após a indução), as ondas do ERG apresentam-se mais lentas principalmente para as intensidades altas, assim como apresentam amplitudes menores quando comparadas com as respostas dos olhos controles tanto para os estímulos escotópicos como fotópicos (Figura 22).

Esses resultados sugerem que a diminuição da amplitude da onda-*a* nas intensidades 0,95 e 9,5 cd.s/m², que provocam respostas escotópicas máximas e saturam os bastonetes, pode estar relacionada com alterações nos cones, enquanto o aumento do tempo implícito encontrado na intensidade 0,095 cd.s/m² pode indicar uma dificuldade de recuperação dos bastonetes (Marmor *et al* 2009; Stockton & Slaughter, 1989). Com relação à onda-*b*, a diminuição da amplitude e o aumento do tempo implícito podem estar relacionados com a dificuldade de recuperação das células bipolares ON (Stockton & Slaughter, 1989; Asi & Perlman, 1992; Weymouth & Vingrys, 2008).

Adicionalmente, outra análise realizada a partir dos dados escotópicos da onda-*b* mostrou uma alteração de sensibilidade, evidenciada pelo parâmetro *k* calculado a partir da equação de Naka-Rushton. A sensibilidade à luz foi menor entre a 10^a e 30^a semana após a injeção intravítrea de *M. Tuberculosis*, sugerindo que o grupo com uveíte autoimune experimental necessita de um estímulo mais intenso para alcançar uma resposta cuja amplitude corresponde à metade da saturação da onda-*b* quando comparado com o grupo controle. A sensibilidade foi recuperada após 40 dias da indução.

Com relação à função temporal do sistema de cones, após analisarmos as respostas da retina estimulando-a em diferentes frequências, nossos resultados sugerem que as fases das respostas dos olhos com UAE e dos olhos controles não se sobrepõem entre o 10^o e 30^o dias após a indução da UAE. Dessa forma, é possível que a uveíte tenha alterado por um determinado período as propriedades temporais das células bipolares ON (Kondo & Sieving, 2001, Viswanathan *et al*, 2002).

Finalmente, nossos resultados morfológicos mostraram dois importantes pontos: 1) não foram encontradas alterações anatômicas na retina após 50 dias da indução da uveíte pela microscopia de luz e 2) mesmo com a arquitetura intacta e após a

biomicroscopia e eletrofisiologia indicarem a recuperação da inflamação, ainda foi possível detectar sinais inflamatórios através da imunomarcação da proteína GFAP.

A expressão de GFAP nas células de Müller é um dos métodos mais sensíveis para detectar lesões retinianas e, no caso da uveíte, esta ativação das células da glia está associada com a regulação de citocinas pró-inflamatórias. Este fenômeno é um fator desencadeador do processo inflamatório da doença (Hauck *et al*, 2006) e, em nosso trabalho, foi o único método que indicou a presença de inflamação após 50 dias da indução.

Em suma, nossos resultados mostraram que no mesmo período que os exames clínicos apontam o auge da inflamação entre 10 e 30 dias após a indução da UAE, a eletrofisiologia da retina indica que a uveíte provoca alterações temporárias e reversíveis nas respostas escóticas, fotópicas e de flicker, sugerindo uma possível necrose e/ou apoptose parcial tanto dos fotorreceptores quanto das células bipolares (Cheng *et al*, 1995). Já a imuno-histoquímica foi o método mais sensível ao detectar sinais de inflamação após 50 dias revelando alterações nas células de Müller.

De um modo geral, a partir dos métodos avaliados, o modelo de uveíte autoimune experimental induzido pela *M. tuberculosis* produz várias características da uveíte humana; tornando o modelo apropriado para o estudo terapêutico do implante biodegradável de MPA.

Capítulo 3

Avaliação do efeito terapêutico do implante intravítreo de ácido micofenólico no modelo de uveíte autoimune experimental em coelho

1. OBJETIVOS

Neste último capítulo, introduzimos o implante intravítreo de ácido micofenólico (MPA) (200 µg) nos olhos direitos dos coelhos modelos de uveíte autoimune experimental (UAE) induzidos com *Mycobacterium tuberculosis* e nosso objetivo foi acompanhar e avaliar o efeito terapêutico do implante através dos registros eletrorretinográficos, de exames clínicos, da microscopia de luz e da imunomarcagem da proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

Para avaliar o efeito terapêutico do implante de MPA na uveíte experimental, os resultados dos olhos direitos induzidos à UAE e implantados com MPA foram comparados com os resultados dos olhos com UAE sem tratamento induzidos no Capítulo 2.

2. MÉTODOS

2.1. Animais

Treze coelhos albinos da raça New Zealand (*Oryctolagus cuniculum*) pesando aproximadamente 2,5 kg foram induzidos à uveíte autoimune experimental (UAE) e utilizados nos estudos clínicos, eletrofisiológicos e morfológicos.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da USP, com ciclo claro/escuro de 12 h/12 h e passaram por um período de adaptação ambiental durante três dias antes dos experimentos serem iniciados.

Todos os animais foram pré-imunizados com uma injeção subcutânea de 10 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco) suspenso em 0,5 ml de óleo mineral. A injeção intravítrea e a implantação do MPA foram realizadas após 14 dias.

2.2. Eletrofisiologia

A primeira sessão do ERG foi realizada antes da indução da implantação e considerada a sessão controle, as sessões seguintes foram realizadas após 10, 20, 30, 40 e 50 dias. No final da última sessão, sob anestesia profunda, os animais foram sacrificados, os olhos foram enucleados e o material foi coletado para a realização dos estudos morfológicos (Figura 32).

Figura 32. Esquema do estudo eletrofisiológico.

Após serem sedados e anestesiados, os animais tiveram seus olhos anestesiados e as pupilas dilatadas e os animais foram submetidos ao seguinte protocolo:

1) Escotópicos: a) foram emitidos 10 flashes de $0,00095 \text{ cd.s/m}^2$ com intervalos entre flashes (IEF) de 5 s; b) após 10 s de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de $0,0095 \text{ cd.s/m}^2$ com IEF de 5 s; c) após 20 s de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de $0,095 \text{ cd.s/m}^2$ com IEF de 10 s; d) após 1 min de adaptação ao escuro, foram emitidos 6 flashes de $0,95 \text{ cd.s/m}^2$ com um IEF de 10 s.

2) Escotópico máximo: após 1 min de adaptação ao escuro, foram emitidos 3 flashes de $9,5 \text{ cd.s/m}^2$ com um IEF de 15 s.

3) Fotópico: após 2 min de adaptação à luz de fundo de 25 cd/m^2 (luz branca); foram emitidos 6 flashes de $9,5 \text{ cd.s/m}^2$ com um IEF de 5 s.

4) Flicker: Sob uma luz de fundo de 25 cd/m^2 (luz branca); foram emitidos 15 flashes de $9,5 \text{ cd.s/m}^2$ em quatro frequências: 12, 18, 24 e 30 Hz.

A análise estatística foi feita no programa SPSS, onde foi verificada a normalidade dos dados, e uma vez que os dados não são normais e os dados independentes, foi utilizado o Teste U de Mann-Whitney juntamente com a correção de Bonferroni.

2.3. Morfologia

Após a última sessão de ERG e antes do final dos efeitos da anestesia, os coelhos foram sacrificados e foi realizada a enucleação bilateral dos globos oculares. Os globos oculares foram fixados e o material foi crioprotegido e emblocado.

Cortes radiais das retinas com $12 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura foram feitos a -24° C em criostato e colocados sobre lâminas histológicas previamente gelatinizadas.

2.3.1. Análises Histopatológicas das Retinas

Para as análises histopatológicas das retinas, os cortes obtidos em criostato tanto do olho direito como do olho contralateral foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), as lâminas foram montadas com DPX e lamínula e observadas em microscópio de luz (Leica DMRXE).

2.3.2. Imuno-histoquímica para identificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Os cortes radiais das retinas foram incubados com o anticorpo primário contra GFAP, anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra a proteína ácida fibrilar glial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 1:1000 em PB 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, por aproximadamente dezesseis horas em temperatura ambiente. Após lavagens com PB 0,1 M pH 7,4, com Triton X-100 a 0,3% (3 lavagens de 10 minutos cada), o material foi incubado com anticorpo secundário CY3 (1:200, SIGMA) e as lâminas foram montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield (Vector Laboratories Inc, California, USA) com DAPI. Os tecidos foram analisados em microscópio de fluorescência (Leica DMRXE) com objetiva de 40x oil (NA = 0.7) ou de 100x oil (abertura numérica, NA = 1.25), com um conjunto de filtros específicos para CY3 (excitação verde, emissão vermelho) e DAPI (excitação UV, emissão azul).

3. RESULTADOS

3.1. Estudo eletrofisiológico

Abaixo, a Figura 33 compara as respostas escotópicas dos olhos com UAE sem tratamento registradas no capítulo 2 (linha vermelha) e dos olhos com UAE tratados com MPA (linha azul) em três momentos: antes da indução e da implantação da droga e após 20 e 50 dias.

Figura 33. ERG escotópico em cinco intensidades diferentes registradas a partir de dois animais em três sessões: antes da indução da UAE e do tratamento e após 20 e 50 dias. As ondas vermelhas representam as respostas do olho com UAE e as ondas azuis, do olho com UAE tratado com MPA.

Como podemos observar na Figura 33, antes mesmo de qualquer procedimento experimental, as amplitudes das respostas na primeira sessão de ERG do grupo sem tratamento apresentaram-se maiores do que as respostas do grupo tratado (ex: as médias das amplitudes da onda-*b* na primeira sessão de ERG para o grupo com UAE e para o grupo com UAE tratado com MPA foram iguais a $259 \mu V \pm 56$ e $208 \mu V \pm 39$ consecutivamente). Esta variabilidade não foi encontrada nos capítulos 1 e 2, pois os dados comparados pertenciam a um mesmo grupo de animais e, neste capítulo 3, os dados comparados foram registrados em animais e tempos diferentes. Com isso, para eliminar esta diferença entre grupos e acompanhar apenas o efeito terapêutico do

implante de MPA, antes de serem analisados, os dados dos ERGs foram normalizados tendo como referência a primeira sessão.

A seguir, na Figura 34, podemos observar os dados já normalizados dos grupos tratados e não tratados e comparar os valores médios dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* nos cinco estímulos escotópicos: 0,00095 (-3 log); 0,0095 (-2 log); 0,095 (-1 log); 0,95 (0 log) e 9,5 cd.s/m² (1 log) nas sessões realizadas antes e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias da indução da UAE e do tratamento com MPA.

A análise descritiva sugere que a eletrorretinografia dos dois grupos comportou-se de forma semelhante ao longo dos 50 dias, com exceção das amplitudes da onda-*b*, que se mostraram menores para o grupo sem tratamento quando comparadas com o grupo tratado no momento em que os exames clínicos indicaram a fase mais inflamada da uveíte (20 dias). Esta observação também pode ser feita após 50 dias da indução.

A análise estatística realizada com o Teste U de Mann-Whitney com correção de Bonferroni mostrou diferenças estatísticas para o tempo implícito da onda-*a* após 10 dias em praticamente todas as intensidades (-3 e -1 log, $p < 0,001$; 0 e 1 log $p < 0,0001$) e após 20 dias, para a intensidade mais baixa ($p < 0,001$) e para as duas mais altas ($p < 0,01$).

A amplitude da onda-*a* da resposta escotópica máxima apresentou-se maior para o grupo tratado após 20 dias ($p < 0,01$). A onda-*b* apresentou-se mais lenta para o grupo tratado após 10 dias (-1 log, $p < 0,001$), 30 dias (-1 log, $p < 0,001$ e 0 log, $p < 0,01$) e 40 dias (-1 log e 0 log, $p < 0,001$) e a amplitude da onda-*b* foi maior para o grupo tratado após 20 dias (-2 log, 0 log e 1 log; $p < 0,001$). Ao compararmos os grupos tratados e não tratados, todos os parâmetros escotópicos descritos acima mostraram-se estatisticamente iguais após 50 dias.

Figura 34. Médias normalizadas dos tempos implícitos e amplitudes das ondas α e β nos cinco estímulos escotópicos: 0,00095; 0,0095; 0,095 e 0,95 cd.s/m² (-3, -2, -1, 0 og consecutivamente) dos olhos com UAE (linha vermelha) e com UAE tratados com MPA (linha azul) registrados em seis sessões: antes e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias da indução e da implantação. Barras verticais = DP. * p<0,01 e ** p<0,001.

Para observarmos com mais detalhes o comportamento funcional da retina em animais com UAE e em animais tratados, separamos as amplitudes e tempos implícitos das respostas escotópicas máximas de seis indivíduos de cada grupo durante os 50 dias de experimentos (dados brutos, não normalizados) (Figura 35) e, ao compararmos os dois grupos, notamos que os animais sem tratamento finalizaram os experimentos com uma variabilidade maior entre os sujeitos e as amplitudes de ambas as ondas tendem a diminuir ao longo das sessões de ERGs.

Figura 35. Amplitudes e tempos implícitos das ondas-a e -b das respostas escotópicas máximas em seis sessões de ERGs. Em vermelho, dados de seis sujeitos do grupo sem tratamento e, em azul, dados de seis animais do grupo tratado com MPA.

A Figura 36 apresenta a função de Naka Rushton ajustada às amplitudes da onda-b em resposta às cinco intensidades para UEA e UEA+MPA.

Figura 36. Médias normalizadas das amplitudes da onda- *b* em função das cinco intensidades de flash de acordo com a equação de Naka-Rushton. Área cinza representa o desvio padrão da sessão pré-indução e pré-tratamento. A) Médias do grupo dos olhos com UAE. B) Médias do grupo dos olhos com UAE tratados com MPA.

Na figura 37, são apresentados os parâmetros da equação de Naka-Rushton ajustada aos dados: amplitude saturada da onda-*b* (**V_{max}**), intensidade necessária para

alcançar 50% de V_{max} (**k**) e inclinação da função (**n**), entre os olhos com UAE e olhos com UAE tratados com MPA. A análise estatística indicou valores maiores de **n** para o grupo com tratamento após 20 e 30 dias ($p<0,01$).

Figura 37. Médias dos parâmetros da equação de Naka-Rushton antes da indução da UAE e do tratamento com MPA e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias. A) Média das amplitudes saturadas da onda-b (**V_{max}**). B) Média das intensidades necessárias para alcançar 50% de V_{max} (**k**) e C) e à inclinação da função (**n**). Em vermelho, representação dos olhos com UAE e, em azul, dos olhos com UAE tratados com MPA. Barras verticais = DP. * $p<0,01$ e ** $p<0,001$.

Abaixo, a Figura 38 apresenta as respostas fotópicas dos olhos com UAE (linha vermelha) e dos olhos com UAE tratados com MPA (linha azul) em três sessões de ERGs.

Figura 38. Respostas fotópicas de dois animais registradas em três sessões: antes da indução da UAE e do tratamento e após 20 e 50 dias. As ondas vermelhas representam os olhos com UAE e as azuis, olhos com UAE tratados com MPA.

Na figura 39, podemos observar as médias dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* das respostas fotópicas ao longo de 50 dias. O tempo implícito da onda-*a* do grupo tratado manteve-se constante ao longo dos 50 dias, porém, com amplitudes menores após 10 ($p < 0,0001$), 20 ($p < 0,0001$), 30 ($p < 0,001$) e 50 dias ($p < 0,001$). Resultados semelhantes foram encontrados para a onda-*b* fotópica: as respostas também foram mais lentas para o grupo sem tratamento após 20 dias ($p < 0,001$) e maiores após 10 ($p < 0,001$) e 20 dias ($p < 0,01$).

Figura 39. Comparação das médias normalizadas dos tempos implícitos e amplitudes das ondas-*a* e -*b* das respostas fotópicas dos olhos com UAE (vermelho) e com UAE tratados com MPA (azul) registrados em seis sessões: antes e após 10, 20, 30, 40 e 50 dias da indução da uveíte e da implantação da droga. **A)** média dos tempos implícitos da onda-*a*. **B)** Média das amplitudes da onda-*a*. **C)** Média dos tempos implícitos da onda-*b*. **D)** Médias das amplitudes da onda-*b*. Barras verticais = DP. * $p < 0,1$.

As respostas fotópicas não normalizadas de cinco sujeitos do grupo sem tratamento e seis do grupo tratado com MPA são apresentadas na Figura 40.

Figura 40. Amplitudes e tempos implícitos das ondas-a e -b das respostas fotópicas em seis sessões de ERGs. Em vermelho, dados de cinco sujeitos do grupo sem tratamento e, em azul, dados de seis animais do grupo tratado com MPA.

Os ERGs obtidos com estimulação intermitente em quatro frequências diferentes: 12, 18, 24 e 30 Hz nos olhos com UAE (vermelho) e nos olhos com UAE tratados com MPA (azul) em três sessões de ERGs podem ser visualizadas na Figura 41.

Figura 41. Respostas intermitentes em quatro frequências diferentes (12, 18, 24 e 30 Hz) de dois animais registradas em três sessões: antes da indução da UAE e da implantação do MPA e após 20 e 50 dias. Em vermelho, respostas dos olhos com UAE e, em azul, dos olhos com UAE tratados com MPA.

O 1º harmônico do flicker foi obtido através da Transformada de Fourier utilizando o programa Matlab (TheMathWorks, EUA). Na figura 42, podemos observar a comparação das médias das amplitudes e das fases do 1º harmônico em resposta às frequências de 12, 18, 24 e 30 Hz entre os grupos com e sem tratamento.

Figura 42. Médias das amplitudes e fases calculadas a partir da Transformada de Fourier do 1º Harmônico das respostas às frequências de 12, 18, 24 e 30 Hz entre o grupo com UAE (em vermelho) e grupo com UAE tratado com MPA (em azul).

O Teste U de Mann-Whitney apontou que a amplitude e fase do grupo tratado foram maiores na frequência de 12 Hz após 50 dias ($p < 0,01$). Para 18 Hz, as amplitudes do grupo não tratado foram maiores após 10 ($p < 0,001$), 20 ($p < 0,01$), 30 ($p < 0,001$) e 40 dias ($p < 0,01$), enquanto que após 50 dias, elas se apresentaram

menores do que o grupo tratado ($p < 0,001$). Por fim, para 30 Hz, apenas a fase do grupo tratado mostrou-se maior após 50 dias ($p < 0,01$).

3.2. Biomicroscopia

Na Figura 43, podemos comparar os resultados dos exames clínicos entre o grupo tratado e não tratado.

Na primeira semana após a indução da UAE, observamos que 20% dos olhos tratados com MPA apresentaram hiperemia da conjuntiva mais intensa do que os não tratados, porém, a partir de 21 dias, 70% dos animais deste mesmo grupo já apresenta a conjuntiva calma, enquanto que o grupo não tratado se recupera apenas após 42 dias.

Nas três primeiras semanas, as células presentes na câmara anterior aparecem em maior quantidade no grupo tratado, 60% chega a ser classificado com 3+, enquanto que o grupo não tratado recebe no máximo 2+. Porém, no final do experimento, o grupo tratado apresenta uma melhor recuperação da inflamação, com mais de 50% apresentando células ausentes, enquanto que todos os animais do grupo não tratado são classificados com 1+.

Com relação à presença de flare, podemos observar que ao longo de todo o experimento, o grupo sem tratamento mostrou-se pior do que o grupo tratado. Enquanto 70% dos animais do primeiro grupo foi classificado com 2+, apenas 10% do grupo tratado recebeu a mesma classificação. Após 42 dias, 15% do grupo sem tratamento havia se recuperado totalmente contra 40% do grupo tratado.

O dado que se destacou diferenciando os dois grupos foi o descolamento de retina observado apenas no grupo implantado com MPA. Após 28 dias da indução da UAE e da implantação da droga, 4 de 10 animais apresentaram descolamento de retina e, após 42 dias, outros dois animais apresentaram descolamento inicial das fibras papilares. Além deste dado, outra observação importante foi a massa branca encontrada no vítreo referente à dissolução do implante com MPA, este material foi um fator que dificultou a realização dos exames clínicos.

Figura 43. Comparação da avaliação clínica dos olhos com uveíte autoimune experimental e dos olhos com uveíte autoimune experimental tratados com MPA.

3.3. Análise morfológica: Microscopia de luz e Imuno-histoquímica

Através da microscopia de luz, em todas as amostras estudadas, os cortes radiais da retina dos olhos controles e dos olhos com uveíte autoimune experimental corados com H&E não apresentaram sinais de dano retiniano e a arquitetura do tecido mostrou-se preservada como ilustrada na Figura 44, onde podemos observar organizadas e coradas com hematoxilina as camadas nuclear externa (CNE), nuclear interna (CNI) e a de células ganglionares (CCG).

Figura 44. Cortes radiais da região central da retina de coelhos corados com H&E. **A)** Corte radial do olho com uveíte autoimune experimental. **B)** Corte radial do olho com uveíte autoimune experimental tratado com implante intravítreo de MPA. CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares. Aumento do microscópio óptico: 40x.

Apesar da histologia clássica mostrar que ambas as retinas dos olhos com UAE e dos olhos com UAE tratados com MPA mantiveram-se organizadas, a análise imuno-histoquímica detectou a presença da proteína GFAP nos dois grupos, com uma marcação um pouco mais forte para o grupo sem tratamento (Figura 45).

Figura 45. (A) Corte radial da retina do olho com UAE sem tratamento marcado com DAPI, (B) mesmo corte imuno-marcado com o anticorpo anti-GFAP e (C) sobreposição das imagens A e B. (D) Corte radial da retina do olho com UAE tratado com o implante de MPA e marcado com DAPI, (E) mesmo corte imuno-marcado com o anticorpo anti-GFAP e (F) sobreposição das imagens D e E. CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares. Aumento do microscópio de fluorescência: 40x.

4. DISCUSSÃO

Como descrevemos anteriormente, o modelo de UAE induzido através da *M. tuberculosis* causou uma uveíte anterior, com pico da inflamação em 21 dias indicado pelo aumento de células na câmara anterior, flare e hiperemia conjuntival, assim como pela diminuição das amplitudes e aumento dos picos de latências. Os exames clínicos e eletrorretinográficos também apontaram uma remissão espontânea da doença após 40 dias da indução, mas a análise imuno-histoquímica indicou sinais de inflamação após 50 dias da indução.

Neste capítulo, nossos resultados clínicos e eletrorretinográficos demonstraram que o implante intravítreo de MPA diminuiu as alterações descritas acima no modelo apenas durante o período de pico da doença, revelando que a droga possui um efeito temporário. Por outro lado, a análise imuno-histoquímica mostrou que o grupo tratado apresentou sinais de inflamação menos intensos do que no grupo não tratado após 50 dias da indução. A seguir discutiremos os três conjuntos detalhadamente:

Um possível efeito do imunossupressor foi apontado pelos exames clínicos no momento do pico da inflamação (após 21 dias da indução), visto que, o grupo tratado apresentou reduções na hiperemia conjuntival, nas células presentes na câmara anterior e no flare após 21 dias de tratamento (Figura 43). Porém, o tratamento não foi capaz de diminuir a incidência da catarata decorrente da doença, a qual foi diagnosticada em 100% dos animais após 35 dias de tratamento.

Um possível efeito colateral apontado no grupo tratado foi o descolamento da retina, que atingiu 6 dos 10 animais testados. A injeção intravítrea do implante aumenta a chance do descolamento no grupo tratado, pois, enquanto o grupo sem tratamento recebeu duas injeções intravítreas de *M. tuberculosis*, o grupo tratado recebeu mais um procedimento invasivo: o implante intravítreo de MPA.

Além disso, a massa branca encontrada no vítreo referente à dissolução do implante pode ter sido ocasionada pela aceleração da liberação da droga. Este fenômeno pode ter ocorrido pela alteração de propriedades físicas e químicas do vítreo ocasionadas pela uveíte, uma vez que, ao dissecarmos a retina, observamos a ocorrência de liquefação do vítreo e este fato pode ter alterado a farmacocinética de liberação da droga descrita nos animais saudáveis. Esta alteração estrutural de vítreos de olhos inflamados foi tema do estudo de Demir e colegas, que coletaram vítreos aspirados de

olhos vitrectomizados de pacientes com uveíte idiopática e apontaram uma hiperatividade das citocinas (proteínas envolvidas na comunicação entre as células durante processos inflamatórios), as quais atraem e degranulam neutrófilos (Demir *et al*, 2006).

A eletrofisiologia mostrou que os dados escotópicos e de flicker dos dois grupos se alternaram ao longo dos 50 dias: ora o grupo tratado com MPA apresentou amplitudes, tempos implícitos e fases maiores do que o grupo sem tratamento; ora apresentou os mesmos parâmetros menores. Porém, uma possível melhora ocasionada pelo implante intravítreo de MPA pode ser observada após 20 dias da indução da UAE, quando as amplitudes da onda-*b* escotópicas dos animais implantados apresentaram-se maiores em todas as intensidades e os picos de latências das respostas fotópicas mantiveram-se próximos aos valores de referência da primeira sessão de ERG.

Como a eletrorretinografia indica uma recuperação, principalmente, da amplitude da onda-*b* escotópica durante a fase mais intensa da uveíte, podemos inferir que o implante de MPA recuperou a função das células bipolares que foram danificadas no processo inflamatório. Alguns estudos demonstram que a recuperação dos tempos implícitos das ondas-*a* e -*b* fotópicas indica uma melhora do curso temporal das respostas dos cones e das bipolares ON (Stockton & Slaughter, 1989; Asi & Perlman, 1992; Kondo & Sieving, 2001, Viswanathan *et al*, 2002; Weymouth & Vingrys, 2008).

Esta melhora funcional observada após 20 dias do tratamento ocorreu simultaneamente com outras observações:

- a) com o pico da inflamação desenvolvida pelo modelo de UAE,
- b) com a melhora nos exames clínicos do grupo tratado e
- c) quando a liberação do MPA no vítreo deixou de ser constante (liberando 100 ng/mL até o 21º dia) e apresentou um pico de 700 ng/mL após 28 dias (Figura 8, Capítulo 1).

Estas observações citadas acima podem nos levar às seguintes conclusões respectivamente:

- a) como o modelo de UAE que utilizamos neste trabalho apresenta uma doença autolimitada, o efeito terapêutico só pôde ser observado durante o pico da inflamação,
- b) tanto os exames clínicos quanto os funcionais indicaram que houve uma melhora das alterações ocasionadas pela uveíte no pico da inflamação e

- c) como a melhora ocorreu no mesmo período em que o dispositivo intravítreo liberou mais droga, temos como hipótese que a dose terapêutica do MPA nos coelhos com UAE seja maior do que 700 ng/mL por dia.

Por fim, a ativação das células da glia mostrou-se maior nos grupos sem tratamento, indicando que, após 50 dias, o implante de 200 µg de MPA é capaz de amenizar o processo inflamatório da doença.

Os efeitos terapêuticos apontados em nossos resultados estariam relacionados com os mecanismos de imunossupressão do MPA, os quais incluem a inibição da proliferação dos linfócitos, a diminuição da glicosilação e a diminuição da expressão e da atividade de moléculas de adesão (Allison & Eugui, 2000).

Até o momento, nenhum estudo sobre o efeito terapêutico do MPA foi publicado, mas, trabalhos que utilizaram o MMF diariamente através da via sistêmica em modelos animais e em pacientes com uveítes apontaram a eficácia deste imunossupressor. Ratos modelos de UAE induzidos com antígeno-S tratados com MMF apresentaram uma inibição da inflamação que, segundo os autores, foi proporcionada pela inibição da adesão entre as células inflamatórias e a parede dos vasos, diminuindo a acumulação das mesmas no local da inflamação e diminuindo a proliferação de linfócitos (Chanaud *et al*, 1995).

Em humanos, Lau e colegas demonstraram que o MMF é um tratamento eficaz para uso em longo prazo no tratamento de uveíte refratária e uveíte posterior, porém, seus resultados demonstraram uma maior eficácia do fármaco, quando este se encontra associado à ciclosporina A (imunossupressora) e prednisolona (anti-inflamatório esteróide) (Lau *et al*, 2003).

Outro estudo acompanhou adultos e crianças com uveíte ao longo de cinco anos e, através de exames clínicos, indicaram que o MMF foi capaz de diminuir a inflamação, porém, a descontinuação de seu uso ocasionou a reincidência da uveíte. Na maioria dos pacientes o MMF foi bem tolerado, com efeitos colaterais leves e transitórios, não requerendo a interrupção do tratamento (Doycheva *et al*, 2011).

Portanto, considerando as limitações dos tratamentos sistêmicos da inflamação ocular autoimune apresentadas atualmente em pacientes, como a alta dose de corticosteroides e imunossupressores que são ingeridos diariamente e seus efeitos colaterais, nossos resultados apontam resultados promissores relacionados à viabilidade do ácido micofenólico liberado pelo implante intravítreo. Evidentemente, por ser o primeiro trabalho sobre o efeito terapêutico do MPA, outros estudos fazem-se

necessários para aprofundarmos o conhecimento com relação à eficácia do dispositivo intravítreo de MPA em olhos inflamados.

5. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho foi o primeiro a testar o efeito terapêutico intravítreo do MPA em modelos de uveíte autoimune experimental. Para iniciarmos o estudo foi necessário testar a toxicidade do implante de 200 µg de ácido micofenólico produzido pelo grupo da UFMG, o qual demonstrou a viabilidade e tolerância do implante intravítreo de dexametasona confeccionado com o mesmo polímero utilizado neste trabalho, copolímero ácido láctico/ácido glicólico, em coelhos (Silva-Cunha *et al*, 2009). Nossos resultados mostraram que o implante intravítreo de MPA é um dispositivo de liberação lenta e estável, apresenta um pico de liberação e parece ser válido para ser testado no modelo de UAE.

Em seguida, este trabalho reproduziu com êxito o modelo de UAE (Cheng *et al*, 1995) e a doença apresentou um pico de inflamação após 20 dias da indução e mostrou-se autolimitada.

Por fim, avaliamos o efeito terapêutico do implante de MPA neste modelo de uveíte e observamos uma diminuição no grau da inflamação no mesmo momento que ocorre o pico da inflamação. Nossos resultados indicaram alguns efeitos colaterais do implante de MPA nos olhos doentes, como o descolamento da retina e a presença da massa branca resultante da dissolução do dispositivo intravítreo de MPA. Estes resultados destacam a importância de se avaliar o efeito terapêutico de drogas em modelos animais e que estudos com a farmacocinética do implante em animais com UAE mostram-se necessários.

Nossos resultados clínicos e funcionais também mostraram uma grande variabilidade no desenvolvimento da doença e no efeito terapêutico (Figuras 35, 40 e 43). Com isso, estudos com um maior número de animais seriam indicados para se estabelecer uma melhor padronização dos resultados.

No entanto, o número de animais utilizado neste trabalho está acima da média do número de animais utilizado em trabalhos que estudaram os efeitos terapêuticos de implantes intravítreos com diferentes drogas e que utilizaram o mesmo modelo animal:

- a) dexametasona (n = 10/grupo) (Cheng *et al*, 1995)
- b) ciclosporina A (n = 6/grupo) (Dong *et al*, 2006)
- c) acetato de triancinolona (n = 8/grupo) (Shin *et al*, 2008)
- d) dexametasona (n = 12/ grupo) (Ghosn *et al*, 2011)

Além disso, os trabalhos listados acima analisaram a eletrorretinografia apenas através da amplitude da onda-*b* da resposta escotópica máxima e nenhum trabalho analisou sinais inflamatórios através de análises imuno-histoquímicas, apenas observaram a presença de lesões na retina através da histologia.

6. REFERÊNCIAS

- Allison AC, Kowalski WJ, Müller CJ, Waters RV, Eugui EM. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc.* 1993;25(3 Suppl 2):67-70.
- Allison, AC, Eugui, EM. Review Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology.* 2000. 85–118
- American Academy of Ophthalmology (AAO). Intraocular Inflammation and Uveitis. 2007. Section 9. San Francisco, CA., 147-223.
- Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev.* 199;136:5-28.
- Allison AC, Eugui EM. Review: Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2003; 31: 487–491
- Alves LS. Causas de cegueira e visão subnormal no Centro Louis Braille - Porto Alegre. *Arq Bras Oftalmol.* 1985;48:65-7.
- Armstrong VW, 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.* 2005;27:315-21.
- Asi, H, Perlman, I. Relationships between the electroretinogram a-wave, b-wave and oscillatory potentials and their application to clinical diagnosis. *Documenta Ophthalmologica.* 1992. 79: 125-139.
- 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.* 2006;370:185-190.
- Baltatzis S, Tufail F, Yu EN, Vredeveld CM, Foster CS. Mycophenolate mofetil as an immunomodulatory agent in the treatment of chronic ocular inflammatory disorders. *Ophthalmology.* 2003;110:1061-5.
- Barboni, M. T. S.; Pangeni, G.; Ventura, D. F.; Kremers, J. (2010). Phase changes in the chromaticity and luminance driven flicker electroretinograms (ERGs) of glaucoma patients. In: Annual Meeting of the Association for Research in Vision

- and Ophthalmology (ARVO 2010). Investigative Ophthalmology and Visual Science, 51: E-abstract 3264.
- Boumpas DT, Kritikos HD, Daskalakis NG. Perspective on future therapy of vasculitis. *Curr Rheumatol Rep.* 2000;2:423-9.
- Caspi RR. Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis. *Drug Discovery Today: Disease Models.* 2006;3:3-9.
- Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, et al. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol.* 1988;140(5):1490-5.
- Chams, H, Rostami, M, Mohammadi F, Ohno, S. Epidemiology and Prevalence of Uveitis: Review of Literature. *Iranian Journal of Ophthalmology* 2009. 21(4):4-16
- Chan TM, Li FK, Tang CS, Wong RW, Fang GX, Ji YL, Lau CS, Wong AK, Tong MK, Chan KW, Lai KN. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. Hong Kong- Guangzhou Nephrology Study Group. *N Engl J Med.* 2000;343:1156- 62.
- Chan C & Li Q. Immunopathology of uveitis. *British Journal of Ophthalmology* 1998;82:91–96.
- Chanaud NP 3rd, Vistica BP, Eugui E, Nussenblatt RB, Allison AC, Gery I. Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by mycophenolate mofetil, an inhibitor of purine metabolism. *Exp Eye Res.* 1995;61:429- 34.
- Chang-Lin JE, Burke JA, Peng Q, Lin T, Orilla WC, Ghosn CR, Zhang KM, Kuppermann BD, Robinson MR, Whitcup SM, Welty DF. Pharmacokinetics of a Sustained-Release Dexamethasone Intravitreal Implant in Vitrectomized and Nonvitrectomized Eyes. *IOVS.* 2011.52:7:4605-09.
- Costa, M. F. (2004). Perdas de função visual na distrofia muscular de Duchenne: visão de cores e visão de contrastes de luminância temporal e espacial. Tese de Doutorado, Instituto Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Damico, FM, Scolari, MR, Ioshimoto, GL, Takahashi, BS, Cunha Jr, AS, Fialho, SL, Bonci, DMO, Gasparin, F, Ventura, DF. Vitreous pharmacokinetics and electroretinographic findings after intravitreal injection of acyclovir in rabbits. *Clinics (USP. Impresso).* 2012.67:931-937.
- D'Amico DJ; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (V.I.S.I.O.N.) Clinical Trial Group; Patel M, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Guyer DR, Katz B. Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: two-year

- safety results of the two prospective, multicenter, controlled clinical trials. *Ophthalmology*. 2006;113:993- 1001.
- Daniel, E., Thorne JE, Newcomb, CW, Pujari, SS, Kaçmaz, O, Levy-Clarke GA, Mycophenolate Mofetil for Ocular Inflammation, Nussenblatt, RB, Rosenbaum, JT, Suhler, EB, Foster, S, Jabs, DJ, Kempen, JH. Review: Uveitis and Immunosuppressive Drugs. 2010. *Am J Ophthalmol*. 149(3): 423–432
- Darrell RW, Wagener HP, Kurland LT. Epidemiology of uveitis. Incidence and prevalence in a small urban community. *Arch Ophthalmol*. 1962;68:502- 14.
- Demir T, Gödekmerdan A, Balbaba M, Türkçüoğlu M, İlhan F, Demir N. The effect of infliximab, cyclosporine A and recombinant IL-10 on vitreous cytokine levels in experimental autoimmune uveitis. *Indian J Ophthalmol*, 2006;54:241-5.
- Dong CJ, Agey P, Hare WA. Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. *Vis Neurosci.*, 2004. 21:533–543.
- Doycheva, D., Zierhut, M., Blumenstock, G., Stuebiger, N., Deuter, C. INFLAMMATORY DISORDERS. Long-term results of therapy with mycophenolate mofetil in chronic non-infectious uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011. 249:1235–1243
- Fauser S, Kalbacher H, Alteheld N, Koizumi K, Krohne TU, Jousen AM. Pharmacokinetics and safety of intravitreally delivered etanercept. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004;242:582-6.
- Fialho SL & Cunha AS. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. *Arq Bras Oftalmol*. 2007;70(1):173-9.
- Fialho SL, Rego MGB, Cardillo JA, Siqueira RC, Jorge R, Cunha Júnior AS. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arq Bras Oftalmol* 2003;66:891-6.
- Galloway, NR. Electrophysiological Testing of Eyes with Opaque Media. *Eye*. 1988; 2, 615--624
- Gao H, Pennesi ME, Oiao X, Iyer MN, Wu SM, Holz ER, Mieler WF. Intravitreal moxifloxacin: retinal safety study with electroretinography and histopathology in animal models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:1606-11.
- Goldblum R. Therapy of rheumatoid arthritis with mycophenolate mofetil. *Clin. Exp Rheumatol*. 1993;11(supl.8):S117-9.
- Gomi CF, Makdissi FF, Olivalves E, Yamamoto JH. Estudo epidemiológico das uveítes. *Rev Med (Sao Paulo)*. 1997; 76:101-8.

- Gouveia EB, Abdalla M, Yamamoto JH, Hirata CE, Kubo P, Olivalves E. Causas das uveítes em serviço terciário em São Paulo, Brasil. *Arq Bras Oftalmol*. 2004;67:139-45.
- Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR, VEGF. Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004;351:2805-16.
- Grailer A, Nichols J, Hullet D, Sollinger HW, Burlingham WJ. Inhibition of human B cell responses in vitro by RS-61443, cyclosporine A and DAB486 IL- 2. *Transplant Proc*. 1991;23(1 Pt 1):314-5.
- Gualtieri, M. (2004). Visão de cores e sensibilidade ao contraste em indivíduos com diabetes melito: avaliação psicofísica e eletrofisiológica. Dissertação de Mestrado, Instituto Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger B, Gerhards H, Ueffing M, Deeg†CA. Retinal Mueller Glial Cells Trigger the Hallmark Inflammatory Process in Autoimmune Uveitis. *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 2121-2131.
- Ishikawa T, Hokama H, Katagiri Y, Goto H, Usui M. Effects of intravitreal injection of tacrolimus (FK506) in experimental uveitis. *Curr Eye Res*. 2005;30:93-101.
- Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, Klancnik JM, Yannuzzi LA, Fisher YL, Sorenson J, Slakter JS, Freund KB, Cooney M, Fine HF. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina*. 2006;26:279- 84.
- Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol*. 2005.140:509-16.
- Jaffe GJ, Yang CS, Wang XC, Cousins SW, Gallemore RP, Ashton P. Intravitreal Sustained-release Cyclosporine in the Treatment of Experimental Uveitis. *Ophthalmology*. 1998.105:1:46-56.
- Kara-José N, Carvalho KM, Pereira VL, Venturini NH, Gasparetto ME, Guchiken MT. Estudo retrospectivo dos primeiros 140 casos atendidos na clínica de visão sub-normal do Hospital das Clínicas da Unicamp. *Arq Bras Oftalmol*. 1988;51:65-9
- Kanski JJ. *Clinical ophthalmology: a systematic approach*. Oxford: Butterworth-Heinemann.1999.

- Kilmartin JD, Fletcher ZJ, Almeida JA, Liversidge J, Forrester JV, Dick AD. CD69 Expression on Peripheral CD41 T Cells Parallels Disease Activity and Is Reduced by Mycophenolate Mofetil Therapy in Uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2001, 42:1285-92.
- Kwak HW, D'Amico DJ. Evaluation of the retinal toxicity and pharmacokinetics of dexamethasone after intravitreal injection. *Arch Ophthalmol*. 1992;110:259-66.
- Kilmartin DJ, Forrester JV, Dick AD. Rescue therapy with mycophenolate mofetil in refractory uveitis. *Lancet*. 1998;352:35-6.
- Kondo, M & Sieving, PA. Primate photopic sinewave flicker ERG: Vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2001, 42, 305–312.
- Lake JR, Shorr JS, Steffen BJ, Chu AH, Gordon RD, Wiesner RH. Differential effects of donor age in liver transplant recipients infected with hepatitis B, hepatitis C and without viral hepatitis. *Am J Transplant*. 2005;5:549- 57.
- Larkin G, Lightman S. Mycophenolate mofetil. A useful immunosuppressive in inflammatory eye disease. *Ophthalmology*. 1999;106:370-4.
- Kunou, N.; Ogura, Y.; Hashizoe, M.; Honda, Y. Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. *Journal of Controlled Release*. 1995.37:143-150.
- Kunou, N.; Ogura, Y.; Yasukawa, T.; Kimura, H.; Miyamoto, H.; Honda, Y.; Ikada, Y. Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Journal of Controlled Release*. 2000. 68:263-271,
- Lau CH, Comer M, Lightman S. Long-term efficacy of mycophenolate mofetil in the control of severe intraocular inflammation. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2003;31:487-91.
- Lee, S.S.; Hughes, P.; Ross, A.D.; Robinson, M.R. Biodegradable Implants for Sustained Drug Release in the Eye. *Pharmaceutical Research*. 2010. 2:2043–2053.
- Lei, B., Yao, G. , Zhang, K. , Hofeldt, K.JU., Chang, B. Study of rod- and cone- driven oscillatory potentials in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2006. 47 (6): 2732-2738
- Malmivuo & Plonsey. *Bioelectromagnetism. Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. New York. Oxford. Oxford University Press. 1995. Site: <http://www.bem.fi/book/index.htm>

- Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006;26:257-61.
- Marmor MF, Holder GE, Seeliger MW, & Yamamoto S. Standard for clinical electroretinography (2004 update). 2008. *Documenta Ophthalmologica* 108, 107–114.
- Mochizuki M, Nussenblatt RB, Kuwabara T, Gery I. Effects of cyclosporine and other immunosuppressive drugs on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985;26:226-32.
- Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM, Allison AC. 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*. 1990;22:1659-62.
- Nussenblatt RB. The natural history of uveitis. *Int Ophthalmol*. 1990;14:303–8. Suttorp-Schulten MS, Rothova A. The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey. *Br J Ophthalmol*. 1996;80:844-8.
- 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*. 2006;142:155-8.
- Pato E, Muñoz-Fernández S, Francisco F, Abad MA, Maese J, Ortiz A, Carmona L. Systematic Review on the Effectiveness of Immunosuppressants and Biological Therapies in the Treatment of Autoimmune Posterior Uveitis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2011, Volume 40, Issue 4, Pages 314-323
- Pereira, J. M., Mendieta, L., Sacai, P. Y., Salomão, S. R., Berezovsky, A. (2003). Estudo normativo do eletrorretinograma de campo total em adultos jovens. *Arq Bras Oftalmol*. 66, 137 – 144.
- Perlman, I. The electroretinogram: ERG. In: H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds). *Webvision: the organization of the retina and visual system*. 1995 Lake City, UT: University of Utah Health Sciences Center.
- Pessôa, C. N., Santiago, L. A., Santiago, D. A., Machado, D. S., Rocha, F. A. F., Ventura, D. F., Hoko, J. N., Pazos-Moura, C. C., Wondisford, F. E., Gardino, P. F., & Ortiga-Carvalho, T. M. (2008). Thyroid Hormone Action Is Required for Normal Cone OPin Expression during Mouse Retinal Development. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49, 2039-2045.

- Qian H, Alexander KR, Ripps H. Harmonic Analysis of the Cone Flicker ERG of Rabbit. *Exp Eye Res.* 2010 December ; 91(6): 811–817.
- Ratanapakorn T, Sinawat S, Sanguansak T, Bhoomibunchoo C, Kaewpanna S, Yospaiboon Y. Effect of Cataract on Electroretinographic Response. *J Med Assoc Thai*, 2010, (93)10.
- Rizzo LV, Silver P, Wiggert B, Hakim F, Gazzinelli RT, Chan CC, et al. Establishment and characterization of a murine CD4+ T cell line and clone that induce experimental autoimmune uveoretinitis in B10.A mice. *J Immunol.* 1996;156(4):1654-60.
- Shin JP, Park YC, Oh JH, Lee JW, Kim YM, Lim JO. Biodegradable Intracocular Implant of Triamcinolone Acetonide in Experimental Uveitis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.*2009;25:201-7.
- Short BG. Safety Evaluation of Ocular Drug Delivery Formulations: Techniques and Practical Considerations. *Toxicologic Pathology.*2008.36:49-62.
- Silva GR, Fialho SL, Siqueira RC, Jorge R, Cunha AS. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012.46:585-05
- Silva-Cunha A, Fialho SL, Naud MC, Behar-Cohen F. Poly-ε-Caprolactone Intravitreal Devices: An In Vivo Study. *IOVS.* 2009. 50:2312-18.
- Schwarz A. New aspects of the treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.*2001;12(supl.17):S44-7.
- Silva, G. R. ; Caldeira, A. S. P. ; Damico, F. M. ; Takahashi, B. S. ; Cunha JR, A. S. ; Fialho, S. L. . Analysis of acyclovir in vitreous humor by a validated high performance liquid chromatography method. *Die Pharmazie.* 2013. v. 68:235-239.
- Smet MD, Simon RJ, Taylor , Bodaghi B, Miserocchi E, Murray PI, 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.* 2011. 30:452-470.
- Sollinger HW, U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation.* 1995;60:225-32.
- Sonoda K, Sasa Y, Qiao H, Tsutsumi C, Hisatomi T, Komiyama S, Kubota T, Sakamoto T, Kawano Y, Ishibashi T. Immunoregulatory Role of Ocular Macrophages: The

- Macrophages Produce RANTES to Suppress Experimental Autoimmune Uveitis. *J Immunol* 2003;171;2652-2659.
- Stockton, RA, Slaughter, MM. B-Wave of the Electroretinogram. A Reflection of ONBipolar Cell Activity. The RockefellerUniversityPress. 1989. 3:101-122.
- Thorne JE, Jabs DA, Qazi FA, Nguyen QD, Kempen JH, Dunn JP. Mycophenolate mofetil therapy for inflammatory eye disease. *Ophthalmology*. 2005;112:1472-7.
- Ventura, D. F., Costa, M. T. V., Costa, M. F., Berezovsky, A., Salomão, S. R., Simões, A. L., Lago, M., Pereira, L. H. M. C., Faria, M. A. M., de Souza, J. M., & Silveira, L. C. L. (2004). Multifocal and full-field electroretinogram changes associated with color-vision loss in mercury vapor exposure. *Visual Neuroscience*, 21, (3): 421-429.
- Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG. Inner-retinal contributions to the photopic sinusoidal flicker electroretinogram of macaques. *Documenta Ophthalmologica*, 2002, 105, 223–242.
- Wachtmeister, L. (1998). Oscillatory Potentials in the Retina: what do they reveal. *Progress in Retinal and Eye Research*, 17 (4): 485 – 521.
- Warrens AN. The evolving role of mycophenolate mofetil in renal transplantation. *QJM*. 2000;93:15-20.
- Weymouth, A.E. , Vingrys, A.J. Rodent electroretinography: Methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2008. 27:1–44
- Wiesner RH, Steffen BJ, David KM, Chu AH, Gordon RD, Lake JR. Mycophenolate Mofetil Use Is Associated with Decreased Risk of Late Acute Rejection in Adult Liver Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2006;6:1609 16.
- 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*. 2001;7:442-50.
- Whitcup SM, Nussenblatt RB. Treatment of autoimmune uveitis. *Ann N Y Acad Sci*.1993;696:307-18.
- Yasukawa, T.M.D.; Kimura, H.; Tabata, Y.; Ogura, Y. Intraocular sustained delivery using implantable polymeric device. *Advanced Drug Delivery Reviews*.2001. 52:25-36.

- Yu SY, Damico FM, Viola F, D'Amico DJ, Young LH. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide: a morphological study. *Retina*. 2006;26:531-6.
- Zhou Y, Rosenthal D, Dutz J, Ho V. Mycophenolate mofetil (CellCept®) for psoriasis: a two-center, prospective, open-label clinical trial. *J Cutan Med Surg*. 2003;7:193-7.

7. ANEXO

Accete da Comissão de Ética em Pesquisa com Animal

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS

**Instituto de Psicologia
USP**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto registrado sob o número 001.2013, para uso de animais em experimentação, intitulado **“Estudo terapêutico do implante intravítreo de MPA em Uveíte autoimune experimental”** sob a Coordenação da Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura, do Prof. Francisco Max Damico e a participação da pesquisadora Gabriela Lourençon Ioshimoto, Doutorado, foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) do Instituto de Psicologia, em reunião de 03 de junho de 2013.

We hereby certify that the Project **“Therapeutic study of MPA intravitreal implant in experimental autoimmune uveitis”**, number 001.2013, submitted by Prof. Dora Selma Fix Ventura, Francisco Max Damico and Gabriela Lourençon Ioshimoto, was approved by the Committee on Ethical Research on Animals (CEPA) of Institute of Psychology from Universidade de São Paulo.

São Paulo, 24 de junho de 2013.

Profa. Dra. Maria Helena Leite Hunziker
Presidente da CEPA

Arlete A. Mendes de Almeida
Secretária da CEPA