ROBERTA PEREIRA DE ALMEIDA MANZANO

**Estudo da toxicidade do adalimumabe
(Humira®) intravítreo para a retina de coelhos**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Programa de: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Walter Yukihiro Takahashi

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Manzano, Roberta Pereira de Almeida

Estudo da toxicidade do adalimumabe (Humira®) intravítreo para a retina de coelhos / Roberta Pereira de Almeida Manzano. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.

Orientador: Walter Yukihiro Takahashi.

Descritores: 1.Fator de necrose tumoral alfa 2.Adalimumabe 3.Injeções intraoculares 4.Toxicidade 5.Retina 6.Coelhos

USP/FM/DBD-475/10

Dedicatória

A meus pais, Marco Antonio e Maria Cristina, pelo amor incondicional e lições transmitidas ao longo da vida. Grandes incentivadores dos meus projetos e sonhos.

A meu marido, Vinícius, pelo amor, respeito e compreensão ao meu trabalho.

A minhas irmãs, Fernanda e Alexandra, pela amizade e carinho sempre.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Walter Y. Takahashi, chefe do Setor de Retina e Vítreo do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pelo valioso voto de confiança e pela orientação desta tese em todas as suas etapas de desenvolvimento.

Ao Dr. Gholam Peyman, grande pesquisador e oftalmologista, que despertou meu interesse pela pesquisa científica, durante meu estágio na Tulane University, New Orleans, EUA.

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro, coordenador do programa de pós-graduação da Universidade de São Paulo, pelo incentivo recebido.

Ao Prof. Dr. Francisco Max Damico, pela amizade e ajuda indispensável neste trabalho.

À Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura, por ter me acolhido em seu laboratório e por permitir que este projeto pudesse se concretizar.

À Profa. Dra. Sylvia Regina Cursino e ao Prof. Dr. Wilson Cursino, pela amizade desde a época de residência e pela inestimável ajuda na análise histopatológica desta tese.

Ao Prof. Dr. Teruo Aihara, por todos os ensinamentos, pela amizade e pelas sugestões apresentadas na elaboração desta tese.

À Profa. Dra. Maria Auxiliadora Monteiro Frazão, pela amizade, exemplo de competência e ajuda na elaboração desta tese.

À Profa. Dra. Joyce Yamamoto, pelas correções e sugestões preciosas.

À Profa. Dra. Maria Cristina Nishiwaki Dantas, pela confiança, incentivo e ensinamentos durante todos estes anos, exemplo de dedicação ao Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Geraldo Vicente de Almeida, cuja ética, saber e dedicação serão sempre um exemplo para mim.

Ao Dr. Ricardo Waetge, pelos ensinamentos, amizade e confiança.

Aos assistentes e estagiários do Setor de Retina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelo carinho e amizade em todos estes anos.

À Profª. Dra. Christina Joselevitch, pelo apoio científico e técnico do Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Às biólogas Renata Genaro Aguiar e Gabriela L. Ioshimoto, pela valiosa ajuda na realização do eletrorretinograma.

Ao biólogo André Maurício Liber pela ajuda no sacrifício dos animais.

Às biólogas Nadia Sambiasi e Júlia Silvestre, pela ajuda na confecção das lâminas e telas para a análise histopatológica.

À Sra. Regina Ferreira de Almeida, pelo carinho e apoio durante o curso de pós-graduação.

A todos os profissionais do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, que participaram, de forma valiosa, em minha formação.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2º ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Antagonistas do Fator de Necrose Tumoral - alfa	4
1.2 Citocinas	6
1.3 Fator de Necrose Tumoral	6
1.4 Papel do TNF- α e de seus antagonistas na oftalmologia	8
1.4.1 no glaucoma	8
1.4.2 nas uveítes	9
1.4.3 no edema macular ..	11
1.4.4 na angiogênese	12
1.5 Efeitos Adversos	14
1.6 Estudos de toxicidade ocular de medicação intravítrea	15
1.6.1 Cultura de células	15
1.6.2 Estudos experimentais em animais	16
1.6.2.1 Modelos experimentais	17
1.6.2.2 Avaliação funcional da retina de coelhos	18
1.6.2.3 Estudos Histopatológicos	21
1.6.2.4 Avaliação clínica	23
1.7 Injeções intravítreas	24
2 OBJETIVOS	29
3 MÉTODOS	31
3.1 Tipo de Estudo	32
3.2 Local	32
3.3 Adalimumabe	32
3.4 Desenho do estudo	33
3.5 Animais	34
3.6 Formação de grupos experimentais	34
3.7 Midríase medicamentosa	35
3.8 Anestesia dos animais	35
3.9 Técnica da injeção intravítrea de adalimumabe nos animais	36
3.10 Descrição do exame biomicroscópico, oftalmoscópico indireto	37
3.11 Descrição do exame eletrorretinográfico	39
3.12 Técnica de sacrifício dos animais	41

3.13	Estudo histológico	42
3.13.1	Coleta e preparo do material para microscopia óptica.....	42
3.13.2	Coleta e preparo do material para microscopia eletrônica.....	43
3.14	Análise estatística	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Achados clínicos	46
4.2	Achados eletroretinográficos	46
4.3	Achados histopatológicos	62
4.3.1	Microscopia óptica	62
4.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão	65
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES	77
7	ANEXOS	79
8	REFERÊNCIAS.....	84

Listas

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
AR	Artrite Reumatoide
ARJ	Artrite Reumatoide Juvenil
°C	grau Celsius
cd.s/m ²	candela, por segundo, por metro quadrado
DNA	desoxirribonucleic acid
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
Dp	Desvio- padrão
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ERG	Eletrorretinograma
et al.	e outros autores
EUA	Estados Unidos da América
ex.	exemplo
ed.	edição
FDA	Food and Drug Administration
Fig.	figura
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Hz	Hertz
INCOR	Instituto do Coração do HCFMUSP
KDA	quilodaltons
LM	light microscopy

ms	milissegundo
mOsm	miliosmol
mRNA	messenger ribonucleic acid
NVC	neovascularização de coroide
OP	oscillatory potentials
P	nível descritivo
pH	potencial hidrogeniônico
PhNR	photopic negative response
PVE	potencial visual evocado
Tab.	tabela
TEM	transmission electron microscopy
TNF- α	tumor necrosis factor - alpha
TNFR-1	tumor necrosis factor- alpha receptor 1
TNFR-2	tumor necrosis factor- alpha receptor 2
TPA	tissue plasminogen activator
UEA	uveorretinite autoimune experimental
VEGF	vascular endothelial growth factor
μ V	microvolt

FIGURAS

Figura 1 -	Técnica de injeção intravítrea no olho do coelho	37
Figura 2 -	Realização da oftalmoscopia indireta	38
Figura 3 -	Coelho posicionado para a realização do eletrorretinograma	41
Figura 4 -	Microscopia óptica de retina do grupo controle.	62
Figura 5 -	Microscopia óptica de retina do grupo de 0,5mg.....	63
Figura 6 -	Microscopia óptica de retina do grupo de 1mg.....	63
Figura 7-	Microscopia óptica de retina do grupo de 2,5mg.....	63
Figura 8 -	Microscopia óptica de retina exposta a 5mg de adalimumabe.	64
Figura 9 -	Microscopia óptica de retina exposta a 10mg de adalimumabe.	64
Figura 10 -	Microscopia eletrônica da retina de um coelho do grupo de 5mg.	65
Figura 11 -	Microscopia eletrônica da retina de um coelho do grupo de 5mg.	66

TABELAS

Tabela 1 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da onda a na resposta escotópica do ERG	48
Tabela 2 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda a na resposta escotópica do ERG	48
Tabela 3 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da onda b na resposta escotópica do ERG	49
Tabela 4 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após a injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda b na resposta escotópica do ERG.....	49
Tabela 5 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da onda a na resposta escotópica máxima do ERG	50
Tabela 6 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda a na resposta escotópica máxima do ERG	50
Tabela 7 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da onda b na resposta escotópica máxima do ERG	51
Tabela 8 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda b na resposta escotópica máxima do ERG	51
Tabela 9 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da onda a na resposta fotópica do ERG	52
Tabela 10 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito da onda a na resposta fotópica do ERG	52
Tabela 11 -	Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da onda b na resposta fotópica do ERG.....	53

Tabela 12 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda b na resposta fotópica do ERG.....	53
Tabela 13 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da onda no <i>Flicker</i> 30 Hz do ERG.....	54
Tabela 14 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda no <i>Flicker</i> 30 Hz do ERG.....	54
Tabela 15 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μ V) da resposta fotópica negativa (PhNR).....	55
Tabela 16 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da resposta fotópica negativa (PhNR).....	55

GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Perfil médio das respostas do ERG do grupo de controle, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe.....	56
Gráfico 2 -	Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 0,5mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe.....	57
Gráfico 3 -	Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 1,0mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe.....	58
Gráfico 4 -	Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 2,5mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe.....	59
Gráfico 5 -	Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 5mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe.....	60
Gráfico 6 -	Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 10mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe.....	61

Resumo

Manzano RPA. *Estudo da toxicidade do adalimumabe (Humira®) intravítreo para a retina de coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 108p.

O adalimumabe (Humira[®], Abbott) é um antagonista do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). É aprovado para o tratamento de artrite reumatoide, espondilite anquilosante, doença de Crohn, psoríase crônica e artrite reumatoide juvenil. É um anticorpo monoclonal que contém apenas sequências humanas de peptídeos contra a molécula do Fator de Necrose Tumoral- α . Na literatura, relatos e série de casos sugerem que os antagonistas do Fator de Necrose Tumoral- α são úteis no tratamento da inflamação ocular, edema macular cistoide e secundário à uveíte e degeneração macular relacionada à idade. Entretanto, a administração sistêmica do adalimumabe pode gerar efeitos adversos graves. A fim de diminuir esses efeitos adversos e aumentar a concentração da medicação no segmento posterior do olho, uma possível opção é a injeção intravítrea. O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade do adalimumabe intravítreo nas diferentes doses para a retina de coelhos por meio de avaliação clínica (biomicroscopia e oftalmoscopia indireta), funcional (eletroretinograma) e histopatológica (microscopia óptica e eletrônica). Foram utilizados 30 coelhos albinos da raça Nova Zelândia divididos em cinco grupos de seis coelhos. Injeções intravítreas foram realizadas nas seguintes concentrações de adalimumabe: 0,5mg/0,1ml, 1mg/0,1ml, 2,5mg/0,1ml, 5,0mg/0,1ml e 10mg/0,2ml e 0,1ml de solução salina balanceada (BSS) foi injetada nos olhos esquerdos dos grupos 1 e 2 para constituir o grupo controle. Foram realizadas biomicroscopia e fundoscopia e sinais de inflamação, infecção ou toxicidade foram observados durante duas semanas. O eletroretinograma foi realizado antes do tratamento e após 14 dias da injeção intravítrea. Os animais foram sacrificados, foi feita a enucleação dos olhos, e o tecido para a avaliação histopatológica foi preparado. A injeção intravítrea de adalimumabe (Humira[®]) nas doses estudadas até 5mg (0,5mg, 1,0mg, 2,5mg, 5mg) não apresentou sinais clínicos, eletroretinográficos e histopatológicos de toxicidade para a retina de coelhos a curto prazo. No grupo de 10mg, foram observados sinais inflamatórios leves em três dos seis olhos e houve diminuição da amplitude da onda a na resposta fotópica do ERG, não foram observadas alterações na microscopia óptica.

Descritores: Fator de Necrose Tumoral – alfa, adalimumabe, injeções intraoculares, toxicidade, retina, coelhos

Summary

Manzano RPA. *Testing intravitreal toxicity of adalimumab (Humira®) in the rabbit* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 108p.

Adalimumab is a fully human anti-TNF alpha monoclonal antibody consisting of 100% human sequences developed using phage display technology. It is currently FDA approved for the treatment of rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, Crohn's disease, moderate to severe chronic psoriasis, and juvenile idiopathic arthritis. Anti-TNF alpha drugs may be an effective therapy for cystoid macular edema associated with uveitis. Significant improvements in chronic diabetic macular edema and regression of CNV from AMD have also been documented in small published series after systemic treatment with TNF- alpha antagonists. However the systemic administration of these drugs can have serious side effects. Intravitreal injection would assure delivery of high concentrations of medication at the posterior segment with minimum side effects. The aim of this study was to evaluate the ocular toxicity of escalating doses of intravitreal adalimumab (Humira®) in the rabbit eye. Thirty New Zealand albino rabbits received intravitreal injections of 0.1ml of adalimumab 0.5 mg (6 eyes), 1mg (6 eyes), 2.5mg (6 eyes), 5mg (6 eyes) and 0.2ml was injected in the 10mg (6 eyes) group. BSS (0,1ml) was injected in the left eye of the rabbits from the groups 1 and 2 to serve as control group. Slit lamp biomicroscopy, fundoscopy were carried out at baseline, day 7 and 14 following intravitreal injection while electroretinography (ERG) was carried out at baseline and day 14. Animals were euthanized on day 14 and histopathological examination of the eyes was performed. The tested doses of intravitreal adalimumab up to 5mg (0.5mg, 1.0mg, 2.5mg, 5mg) had no associated ocular short-term toxicity in rabbit eyes. The 10mg group showed mild inflammatory reaction in 3 out of 6 eyes and showed decrease in the a wave amplitude in the photopic response, light microscopy was normal.

Descriptors: Tumor Necrosis Factor- alpha, Adalimumab, intraocular injection, toxicity, retina, rabbits

1 Introdução

Os antagonistas do fator de necrose tumoral- alfa (TNF), adalimumabe, infliximabe e etanercepte provaram ser revolucionários no tratamento das doenças inflamatórias. Eles são amplamente utilizados no tratamento da artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, espondiloartropatias, Doença de Crohn e psoríase ⁽¹⁻⁶⁾.

Na literatura, relatos e série de casos sugerem que os antagonistas do TNF são úteis no tratamento da inflamação ocular, edema macular cistoide e degeneração macular relacionada à idade (DMRI). Entretanto, os estudos publicados, na maioria, são séries de casos e estudos pilotos ⁽⁷⁻¹⁴⁾.

Após o sucesso da terapia antiangiogênica, com os antagonistas do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) Bevacizumabe (Avastin®) e Ranibizumabe (Lucentis®), há um interesse crescente em bloquear outras partes da cascata inflamatória. Embora a interação entre as citocinas seja extremamente complexa, parece que o Fator de Necrose Tumoral (TNF) tem um papel mais proximal do que o VEGF na cascata inflamatória. Esta foi a conclusão de um estudo realizado por Armstrong et al., no qual foram achados que a produção de VEGF era mantida após um período de atividade do TNF ⁽¹⁵⁾. Assim, seria possível por meio do controle do TNF melhorar quadros de neovascularização de coroide e edema macular de uma maneira mais profunda do que apenas o bloqueio da atividade do VEGF ⁽¹⁵⁾.

Entretanto, a administração sistêmica do adalimumabe pode gerar efeitos adversos graves. Para diminuir estes efeitos adversos e aumentar a concentração da medicação no segmento posterior do olho, uma possível opção é a injeção intravítrea.

No entanto, sabemos que a maior preocupação quando injetamos uma medicação na cavidade vítrea, é a toxicidade para a retina. É imprescindível estabelecer a dose segura das medicações, dose esta que não cause danos às estruturas oculares.

Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido realizados para estabelecer a dose segura de diversas drogas de potencial interesse para uso intraocular. Os primeiros trabalhos nessa linha de pesquisa estudaram as doses seguras de diversos antibióticos para o tratamento da endoftalmite ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Exemplos mais recentes dessa linha de estudo são: o bevacizumabe (Avastin®) ⁽¹⁹⁾, o acetato de triancinolona ⁽²⁰⁾, a indocianina verde ^{(21) (22)}, o infliximabe ⁽²³⁾, o etanercepte ⁽²⁴⁾, a rapamicina ⁽²⁵⁾, o cetorolac ⁽²⁶⁾, entre outros.

Esta pesquisa foi a continuação de um estudo piloto realizado na Tulane University, New Orleans e publicado, em 2008 ⁽²⁷⁾. No estudo piloto, 1mg de adalimumabe foi tóxico para a retina de coelhos ⁽²⁷⁾. Entretanto, em outro trabalho realizado por Tsilimbare et al. 5 mg de adalimumabe não mostraram sinais de toxicidade ⁽²⁸⁾. Desse modo, decidimos realizar esta pesquisa com maior número de olhos e diferentes doses de adalimumabe e acrescentar a microscopia eletrônica que não havia sido realizada no primeiro estudo.

1.1 ANTAGONISTAS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL -ALFA

O adalimumabe (Humira[®], Abbott) é um antagonista do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), foi aprovado para o tratamento da artrite reumatoide (AR) em 2002. É um anticorpo monoclonal totalmente humano, contendo apenas sequências humanas de peptídeos contra a molécula do TNF- α . É produzido por tecnologia recombinante do ácido desoxirribonucleico (DNA) em sistema de expressão de células de mamíferos. Possui 1.330 aminoácidos e apresenta um peso molecular de, aproximadamente, 148 quilodaltons ^(29, 30). O adalimumabe liga-se especificamente ao TNF, neutralizando sua função biológica e bloqueando sua interação com os receptores de TNF p55 e p75 na superfície celular. Assim como o infliximabe, o adalimumabe liga-se ao TNF- α solúvel e ligado à membrana e também pode ocasionar a lise das células que expressam TNF- α em sua superfície ⁽³¹⁾. É administrado via subcutânea e tem meia vida de 2 semanas. Está aprovado para o tratamento da artrite reumatoide (AR), artrite psoriática, espondilite anquilosante, doença de Crohn e artrite reumatoide juvenil (ARJ) ⁽³²⁾.

Os outros antagonistas do TNF- α são o etanercepte (Enbrel[®]), o infliximabe (Remicade[®]), o golimumabe (Simponi[®]) e o certolizumabe pegol (Cimzia[®]).

Em 1998, o etanercepte foi o primeiro anti-TNF- α aprovado nos Estados Unidos da América (EUA) para o tratamento da artrite reumatoide (AR). O etanercepte é uma proteína de fusão solúvel do receptor p75 do TNF- α ⁽³³⁾, é administrado por via subcutânea, duas vezes por semana, e até o momento está aprovado para o tratamento da artrite reumatoide, artrite psoriática e espondilite anquilosante.

O infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico que se liga ao TNF- α solúvel e transmembrana, impedindo sua ligação com os receptores celulares de TNF- α , bloqueando assim a cascata inflamatória que seria desencadeada por esta citocina. O infliximabe foi o primeiro anti-TNF- α aprovado pelo *U.S Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento da doença de Crohn, em 1998; em 1999, foi aprovado para o tratamento da AR. É administrado através de infusão endovenosa e possui meia vida de 8 a 9,5 dias^(33, 34).

Outro novo antagonista do TNF- α é o certolizumabe pegol (Cimzia[®]). Aprovado pelo FDA para o tratamento da artrite reumatoide e doença de Crohn, em 2008. Consiste de um fragmento humanizado do anticorpo contra o TNF- α conjugado ao polietileno-glicol. O polietileno-glicol aumenta a meia vida plasmática da droga, permitindo aplicações a cada 2 a 4 semanas e pode contribuir com a melhor distribuição da droga aos tecidos inflamados⁽³⁵⁾.

Em 2009, o golimumabe (Simponi[®]) foi aprovado pelo FDA para o tratamento da artrite reumatoide, artrite psoriática e espondilite anquilosante. Assim como o adalimumabe, o golimumabe é um anticorpo monoclonal totalmente humano contra o TNF- α , mas as sequências dos aminoácidos das cadeias leves e pesadas são idênticas às do infliximabe. É administrado mensalmente por meio de injeções subcutâneas⁽³⁶⁾.

1.2 CITOCINAS

Citocinas são proteínas de sinalização celular que controlam as interações entre as células do sistema imunológico onde foram primeiramente identificadas. Formam um grupo diversificado e regulam não apenas as respostas inflamatórias locais e sistêmicas, mas também a cicatrização de feridas, a hematopoese e outros processos biológicos. Até hoje, foram identificadas mais de cem citocinas estruturalmente distintas e geneticamente não relacionadas. Trata-se de compostos extremamente potentes, que atuam em baixíssimas concentrações através de sua ligação a receptores específicos nas células-alvo. A maioria parece atuar apenas localmente, de maneira parácrina (isto é, em células adjacentes) ou autócrina (na própria célula que a produz). Muitas são funcionalmente redundantes, isto é, verifica-se uma extensa superposição de suas atividades. Além disso, uma citocina pode induzir a secreção de outras ou de mediadores, produzindo assim uma cascata de efeitos biológicos. São produzidas e liberadas por várias células, como macrófagos, monócitos, linfócitos, adipócitos e células endoteliais⁽³⁷⁾.

1.3 FATOR DE NECROSE TUMORAL

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) originalmente foi identificado como fator presente no plasma de animais tratados com endotoxina, podendo causar necrose hemorrágica de tumores. Em baixas concentrações, estimula as funções dos fagócitos mononucleares e atua como ativador policlonal dos linfócitos B, respostas dos

hospedeiros que contribuem para a eliminação das bactérias invasoras. No entanto, altas concentrações de TNF causam lesão tecidual, coagulação intravascular disseminada e choque, muitas vezes, resultando em óbito. Desta forma, o TNF é um mediador das imunidades naturais e adquiridas e um importante elo de ligação entre respostas imunes específicas e inflamação aguda ⁽³⁷⁾.

O TNF refere-se a uma família de 19 citocinas com importantes funções na inflamação e apoptose. O subtipo TNF- α é uma proteína de 17 quilodaltons (kDA) composta por 185 aminoácidos. É produzido por monócitos, macrófagos, linfócitos T e, em menor grau, por neutrófilos e mastócitos. Promove a inflamação por citotoxicidade direta, assim como por outros mecanismos indiretos, incluindo a regulação da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, dos mediadores do ácido araquidônico, das metaloproteinases, das moléculas de adesão e dos fatores angiogênicos ^{(38) (39) (40)}.

Possui várias ações pró-inflamatórias e imunorregulatórias como aumento da ativação dos linfócitos T-auxiliares (*T-helper*) e da produção de imunoglobulinas e indução da resposta de fase aguda pelo fígado. Nesta situação, os hepatócitos aumentam a produção de proteínas plasmáticas importantes para a defesa inespecífica do hospedeiro contra infecções, como por exemplo, a Proteína C-reativa ⁽³⁷⁾.

Sua ação biológica ocorre pela ligação aos receptores, o receptor do TNF, TNFR-1 ou p55 é o receptor solúvel e está presente na maioria dos tipos celulares, já o TNFR-2 ou p75 é o receptor ligado à membrana e está restrito apenas a alguns tipos celulares, como células endoteliais e hematopoéticas, sua expressão necessita ser induzida. O receptor TNFR-1 é o mediador da apoptose e da cascata pró-

inflamatória ⁽⁴¹⁾, e o TNFR-2 regula a proliferação e o crescimento celular ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. A ação do TNF- α *in vivo* é complexa, variando em função do tecido e dos receptores ativados.

Níveis elevados de TNF- α têm sido relacionados com várias doenças inflamatórias graves, como artrite reumatoide, doença de Crohn, espondiloartropatias, uveíte ^(2, 45), doença de Alzheimer ⁽⁴⁶⁾ e esclerose múltipla ⁽⁴⁷⁾.

A neutralização do TNF- α desativa a cascata pró-inflamatória, levando a uma diminuição da migração de células inflamatórias, diminuição da angiogênese mediada pelo Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), diminuição das proteínas de fase aguda e de permeabilidade vascular ^{(39) (40)}.

1.4 PAPEL DO TNF- α E DE SEUS ANTAGONISTAS NA OFTALMOLOGIA

1.4.1 No glaucoma

No olho, há evidências de que a neurotoxicidade mediada pelo TNF- α está relacionada com a degeneração do nervo óptico nos pacientes com glaucoma ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Foi observado aumento da expressão do receptor de TNF (TNF-R1) nos pacientes com lesão glaucomatosa do nervo óptico ⁽⁴⁹⁾. Em estudos experimentais, após injeção intravítrea de TNF- α em olhos de ratos ⁽⁵¹⁾ e coelhos ⁽⁵²⁾, observaram-se degeneração axonal do nervo óptico e perda tardia das células ganglionares. Outro estudo demonstrou que a liberação do TNF- α pelas células gliais é induzida pela isquemia e

pelo aumento da pressão hidrostática, resultando na morte das células ganglionares da retina ⁽⁵³⁾. Estes achados suportam a hipótese de que o TNF- α possa estar envolvido na patogênese de doenças neurodegenerativas oculares.

1.4.2 Nas uveítes

A uveorretinite autoimune experimental (UAE) é um dos modelos animais de uveíte difusa autoimune (endógena) mais estudados e é muito utilizada para avaliar a eficácia de diversos imunossupressores ⁽⁵⁴⁾. Em modelos experimentais de uveíte autoimune, o TNF- α exacerbou a uveíte e o anticorpo anti-TNF- α inibiu o aparecimento da uveíte em ratos ⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾.

Vários estudos vêm demonstrando a importância do TNF na inflamação ocular. Foi relatado que a concentração de TNF no plasma e no aquoso foi maior em pacientes com uveíte do que no grupo controle ⁽⁵⁷⁾. Outro estudo demonstrou níveis aumentados de TNF na oftalmia simpática ⁽⁵⁸⁾. Em um estudo experimental com ratos deficientes nos receptores do TNF (p55 e p75), foi observada inflamação ocular mais leve nesses animais do que no grupo controle ⁽⁵⁹⁾.

Vários estudos retrospectivos têm sido publicados demonstrando a eficácia do infliximabe endovenoso no tratamento da uveíte em crianças ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾. Richards et al. descreveram seis crianças com uveíte associada à artrite reumatoide juvenil que apresentavam uveíte recalcitrante, mesmo com corticosteroides tópicos e imunomoduladores sistêmicos. A resposta ao infliximabe foi boa em todas as crianças. O tempo de seguimento do estudo variou de 3 a 26 meses ⁽⁶⁰⁾.

Em outro estudo realizado por Khan et al., foram avaliadas retrospectivamente 17 crianças. Dez tinham uveíte associada à artrite reumatoide juvenil, seis tinham pan-uveíte e uma, uveíte intermediária. Dez destas crianças apresentaram melhora importante, após a primeira infusão endovenosa de infliximabe. Todos os pacientes ao final do seguimento não apresentavam reação inflamatória de câmara anterior ⁽⁶²⁾.

O etanercepte tem mostrado resultados mais variáveis. Em um estudo pequeno (n=7), prospectivo sem grupo controle, o etanercepte foi usado para o tratamento de uveíte associada à artrite reumatoide juvenil com resultados promissores ⁽⁶³⁾. Entretanto, o resultado não foi confirmado por Smith JA et al. em um estudo randomizado, com grupo controle, duplo cego com 12 pacientes ⁽⁶⁴⁾. Além disso, existem vários relatos do aparecimento de uveítes em pacientes com artrite reumatoide juvenil que estão sendo tratados com etanercepte ^(65, 66).

O adalimumabe, administrado via subcutânea, também tem se mostrado eficaz para o tratamento de uveíte em crianças. Em um estudo prospectivo com 14 crianças portadoras de uveíte, nove eram associadas a ARJ e cinco apresentavam uveíte idiopática, 13 crianças mostraram importante melhora da inflamação que foi mantida por uma média de 18 meses, após o início da terapia. A resposta foi observada nas primeiras 2 a 6 semanas de tratamento ⁽⁶⁷⁾. Em outro estudo retrospectivo, foram avaliadas 18 crianças, sendo 17 com uveíte associada à ARJ; 16 mostraram uma boa resposta ao tratamento, um apresentou resposta moderada e um não mostrou nenhuma melhora, 15 crianças foram capazes de parar com a corticoterapia sistêmica e em três foi possível diminuir a dose do corticoide ⁽¹⁰⁾.

O adalimumabe também foi efetivo no tratamento da uveíte associada à espondiloartropatia ⁽⁶⁸⁾; sendo eficaz no controle de três casos de Doença de Behçet resistentes ao infliximabe ⁽⁶⁹⁾. Em outro estudo, 11 pacientes com Doença de Behçet ocular foram tratados com adalimumabe e 10 pacientes obtiveram completa resolução da inflamação em 4 semanas. Dos 21 olhos estudados, 17 apresentaram melhora da acuidade visual de mais de três linhas após um seguimento de 10,8 meses ⁽⁸⁾.

Entretanto, esses trabalhos na maior parte são estudos retrospectivos ou série de casos, com número pequeno de pacientes e com tempo de seguimento diferentes. Apesar dessas limitações, é certo que o bloqueio do fator de necrose tumoral é efetivo na diminuição da inflamação ocular.

1.4.3 No edema macular

O TNF- α parece estar envolvido na patogênese do edema macular por aumentar a permeabilidade vascular e estimular a produção de VEGF ⁽⁷⁰⁾.

Em um estudo com 10 pacientes com edema macular cistoide (EMC) crônico associado à uveíte tratados com infliximabe, todos obtiveram melhora da acuidade visual e diminuição do EMC, e seis apresentaram resolução completa ⁽¹³⁾.

O etanercepte também foi eficaz no tratamento do EMC secundário à uveíte intermediária refratária ao uso de corticoides e imunossupressores ⁽¹²⁾.

O infliximabe mostrou-se eficaz no tratamento do edema macular diabético grave refratário a fotocoagulação, com melhora anatômica e funcional em quatro de

seis olhos, após duas infusões endovenosas de infliximabe. Após 4 a 7 meses de seguimento, apenas dois olhos apresentaram recorrência do edema macular, mas em menor intensidade ⁽⁷¹⁾.

Entretanto, um estudo piloto com etanercepte intravítreo para pacientes com edema macular diabético, não evidenciou melhora após 3 meses de tratamento. Nesse estudo foram incluídos sete pacientes com edema macular diabético refratário ao tratamento convencional que receberam duas injeções consecutivas de etanercepte intravítreo com um intervalo de 2 semanas entre cada aplicação. Foram realizadas medidas de acuidade visual, fundoscopia e angiofluoresceinografia, antes do estudo começar, semanalmente no primeiro mês, e depois mensal nos segundo e terceiro meses. Não foram observadas reações adversas em nenhum paciente, porém não houve melhora do edema macular nesses pacientes ⁽⁷²⁾.

1.4.4 Na Angiogênese

Em um modelo animal de neovascularização de coroide (NVC) induzida pelo laser em ratos, foram observados níveis elevados de TNF- α no EPR e na coroide, após o estímulo para a formação da NVC. A inibição do TNF- α reduziu a formação de NVC, sugerindo que o TNF- α deva estar envolvido no desenvolvimento da NVC ⁽⁷³⁾.

Recentemente, foi publicado um estudo experimental com macacos que mostrou que tanto o bevacizumabe como o adalimumabe injetados no vítreo reduziram a formação de neovascularização de coroide induzida pelo laser ⁽⁷⁴⁾.

Pacientes em tratamento sistêmico com infliximabe para artrite reumatoide que apresentavam concomitantemente a forma exsudativa da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) apresentaram melhora do quadro ocular, após o tratamento com anti-TNF- α ⁽¹⁴⁾.

Além disto, pacientes com DMRI que apresentam monócitos sanguíneos que expressam altos níveis de TNF- α ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) demonstraram um aumento em cinco vezes na prevalência de DMRI exsudativa ⁽⁷⁵⁾.

Em seres humanos, o TNF- α foi encontrado em altas concentrações em olhos com retinopatia diabética proliferativa ^{(76) (77)} e no plasma desses pacientes ^{(78) (79) (80)}. Em um modelo animal, o etanercepte evitou o desenvolvimento de retinopatia diabética em ratos ⁽⁸¹⁾.

Pacientes com artrite reumatoide tratados com infliximabe e glicocorticoides apresentam menores níveis de VEGF no plasma ⁽⁸²⁾. Existe relato de paciente com neovascularização de retina secundária à doença de Behçet que apresentou regressão dos neovasos de retina, após 8 meses do tratamento com infliximabe, além de importante melhora da inflamação ocular ⁽⁸³⁾. Em outro relato de caso, os autores descrevem um paciente com Doença Mista do Colágeno que apresentava tumores vasoproliferativos bilaterais e após a administração endovenosa de infliximabe mostrou regressão dos tumores e melhora do edema macular ⁽⁸⁴⁾.

Ainda não se sabe se o TNF- α está envolvido direta ou indiretamente na angiogênese por meio da ativação de outros fatores, como VEGF, interleucina-6 e interleucina-8.

1.5 EFEITOS ADVERSOS

Os principais efeitos adversos relacionados ao tratamento com os inibidores do TNF- α são: infecções (sobretudo a tuberculose) ^{(85) (86)}, doenças autoimunes ⁽⁸⁷⁾, doenças desmielinizantes ⁽⁸⁸⁾, neoplasias (linfoma) ⁽⁸⁹⁾ e insuficiência cardíaca congestiva ^(90, 91). Além da reação alérgica aguda, que ocorre em 5% dos casos de administração endovenosa do infliximabe ^{(92) (93)}.

Dixon et al. relataram uma incidência de tuberculose de 0.5, 1.5, 0.9 casos por 1.000 pacientes/ano tratados, respectivamente, com etanercepte, infliximabe e adalimumabe. Sendo assim, a tuberculose ocorre com mais frequência nos pacientes tratados com infliximabe e adalimumabe do que nos que recebem etanercepte ⁽⁸⁶⁾.

Infecções oportunistas também têm sido descritas com o uso dos antagonistas do TNF, como histoplasmose, listeriose, aspergilose pulmonar e pneumonia por *Pneumocystis carinii* ⁽⁹⁴⁾.

Efeitos colaterais neuro-oftalmológicos como neuropatia óptica anterior, paralisia do nervo oculomotor e mais de 15 casos de neurite óptica foram descritos, após uso sistêmico dessas medicações ^(95, 96).

1.6 ESTUDOS DE TOXICIDADE OCULAR DE MEDICAÇÃO INTRAVÍTREA

Antes de se aplicar uma medicação intravítrea, deve-se pesquisar sua toxicidade para as estruturas oculares. Os testes-chave para avaliar a biocompatibilidade de uma nova droga para a retina são: cultura de células e estudos experimentais com animais ^(97, 98).

1.6.1 Cultura de Células

Modelos de cultura de células do epitélio pigmentar da retina (EPR) ou células neuroretinianas permitem uma avaliação sistemática da toxicidade da droga de uma maneira controlada ^(99, 100).

A cultura de células é um modelo bem estabelecido dos testes pré-clínicos *in vitro*, é um método seguro, de relativo baixo custo, bem controlado e versátil. As células da retina podem ser expostas a diferentes concentrações da droga. Distintos tipos celulares podem ser testados para avaliar as alterações metabólicas e apoptóticas, após a exposição da droga. As mais comumente utilizadas são: células do EPR humano (ARPE-19), células da retina neurosensorial de ratos (R28), células ganglionares da retina de ratos (RGC-5) ^{(101) (102)}, células endoteliais microvasculares humanas (HMVECad) ⁽¹⁰³⁾, linha imortalizada de células de Muller ⁽¹⁰⁴⁾ e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) ⁽¹⁰⁵⁾.

Toxicidade é um evento complexo *in vivo*, em que pode haver dano celular direto, alterações fisiológicas, inflamação e outros efeitos sistêmicos. Sendo assim é

difícil monitorar esses efeitos *in vitro*, a maior parte dos estudos determina os efeitos celulares, chamados de citotoxicidade. Importantes funções celulares como apoptose, adesão, migração e proliferação celular podem ser monitoradas *in vitro* ^(106, 107).

1.6.2 Estudos experimentais em animais

Estudos pré-clínicos de toxicidade em animais são desenhados para expor um número limitado de animais à dose mais alta de uma medicação para determinar seu potencial efeito tóxico. Técnicas de eletrofisiologia visual e avaliação histopatológica podem identificar os efeitos adversos da medicação, tendo assim um importante papel no desenvolvimento de novas drogas ⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾.

Há várias vantagens ao estudar a toxicidade das drogas em modelos animais. Em primeiro lugar, pode-se testar várias doses para determinar a dose tóxica e sua margem segura. Diferentes componentes da formulação da droga podem ser testados separadamente, para que possamos identificar qual é o componente tóxico. Os exames eletrofisiológicos e morfológicos podem ser realizados em modelos de toxicidade aguda ou crônica, permitindo a identificação das estruturas da retina e do mecanismo celular afetado. Enfim, os estudos em animais nos fornecem valiosas informações dos mecanismos celulares e moleculares dentro da retina, sua importância para a função da retina e sua susceptibilidade aos componentes específicos de uma medicação ⁽¹¹²⁾.

Os múltiplos métodos de avaliação das drogas têm levado a algumas confusões sobre sua toxicidade. Por exemplo, em um modelo de cultura celular um

agente químico pode ser seguro em certa concentração e, no modelo experimental *in vivo*, sinais específicos de toxicidade podem aparecer. Essas observações resultam da complexidade e dificuldade de replicar o meio intraocular em modelos de cultura de células ⁽⁹⁸⁾.

1.6.2.1 Modelos Experimentais

A escolha da espécie de animal para testar a toxicidade das drogas para a retina depende de uma série de fatores. Semelhanças das estruturas oculares ao olho humano, disponibilidade, custo, facilidade de manuseio e conhecimento sobre a estrutura e função retiniana da espécie. Em relação à semelhança estrutural ao olho humano; o macaco seria o melhor animal, entretanto são animais caros e de difícil obtenção. Já os ratos e coelhos são criados para uso em laboratório e apresentam baixo custo. Mas, a utilização do rato apresenta como desvantagem o menor tamanho do olho e a maior dificuldade para utilizá-lo em pesquisa, quando comparado ao coelho ⁽¹¹²⁾.

Existem diferenças entre o olho do coelho e o olho humano que devem ser consideradas. O olho do coelho apresenta uma menor espessura escleral, maior fluxo coroidal ^{(113) (114)}, menor volume vítreo e uma retina pouco vascularizada. O volume do vítreo humano é, aproximadamente, 4,0ml e o do coelho é de 1,5ml ⁽¹¹⁵⁾. Além disso a retina do coelho possui predominantemente bastonetes, apesar de não apresentar fóvea, possui uma região semelhante com um número pequeno de cones denominada “*visual streak*”. Quando são albinos, o epitélio da retina não apresenta pigmento. Os coelhos albinos são os preferidos para estudos experimentais, pois

além de serem mais dóceis e de mais fácil manuseio, a pigmentação ocular pode ser um fator de proteção contra os efeitos tóxicos das drogas ⁽¹¹⁶⁾.

Apesar destas diferenças, as semelhanças anatômicas existentes são numerosas o suficiente para justificar a utilização desse animal em modelos experimentais de oftalmologia, sobretudo quando os tecidos oculares dos mesmos são avaliados para exame histopatológico.

1.6.2.2 Avaliação funcional da retina de coelhos

O eletrorretinograma (ERG) de campo total é um exame não invasivo, muito utilizado na oftalmologia para avaliação de doenças retinianas. O ERG representa a atividade elétrica gerada na retina em resposta ao estímulo luminoso. Cada componente da resposta do ERG origina-se de estruturas diferentes da retina e este conhecimento permite a localização da disfunção nas distintas doenças da retina ^(117, 118).

A estimulação é feita por uma fonte de luz de diversas intensidades luminosas: feixe de luz ou flash. Este procedimento permite o registro de uma onda bifásica e os dois componentes considerados com mais frequência na avaliação da integridade elétrica da retina são: onda-**a** e onda-**b**. Também são frequentemente encontrados registros de onda-**c**, além de potenciais oscilatórios (OPs) ^{(119) (120-122)}.

A onda **a** é uma deflexão negativa gerada nos fotorreceptores (cones e bastonetes) ⁽¹²³⁾. A onda **b** é positiva, originada na camada nuclear interna, sobretudo nas células bipolares e núcleos das células de Muller ⁽¹²⁴⁾. Estas ondas são caracterizadas por elementos temporais (latência, tempo de culminação e duração,

medidos em *ms*) e bioelétricos (medida da amplitude, em microvolts μV). Latência é o tempo que se passa entre o início do estímulo e o aparecimento da onda. Duração é o tempo consumido entre o aparecimento e o término da onda. Tempo de culminação ou tempo implícito é o tempo entre o início do estímulo e o momento em que a onda atinge sua máxima amplitude. Amplitude é a altura da onda em relação à linha de base ou isoeletrica ⁽¹²⁰⁻¹²²⁾.

Muitas vezes, no início da onda-**b**, é possível notar ondas de pequena amplitude; que são os potenciais oscilatórios. Estas ondas originam-se na camada plexiforme interna ^{(125) (126)}.

A resposta negativa fotópica (PhNR do inglês “*photopic negative response*”) é o potencial negativo que aparece, após a onda **b** no ERG fotópico. A PhNR, originada nas células ganglionares da retina e seus axônios, reflete a função da retina interna. Estudos recentes mostram que a PhNR encontra-se alterada em doenças oculares que afetam a camada das células ganglionares, como glaucoma, retinopatia diabética e oclusão de artéria central da retina ^{(127) (128) (129) (130)}.

O registro de ERG pode ser feito sob duas condições, em adaptação ao escuro - ERG escotópico - ou sob luz ambiente, sem adaptação prévia ao escuro - ERG fotópico. Clinicamente, é possível obter respostas específicas de cones e bastonetes, alterando o nível de adaptação (ERG fotópico ou escotópico), além de variações na iluminação de fundo, intensidade do flash, cor do flash e grau de estimulação ^(118, 131). Por exemplo, usando diferentes frequências de intermitência do estímulo (*flicker*) é possível separar a contribuição de cones e bastonetes no ERG. Os bastonetes não são capazes de perceber o estímulo acima de 15 pulsos de luz por segundo, entretanto os cones facilmente percebem estímulos de *flicker* a 30 Hz e até a 50 Hz ⁽¹³²⁾.

Embora a retina dos coelhos não apresente mácula, a quantidade de cones é suficiente para gerar resposta elétrica aos estímulos.

O eletrorretinograma é utilizado na maioria dos estudos sobre toxicidade retiniana de drogas, pois é o único exame capaz de avaliar funcionalmente a retina em animais. Apresenta relativo baixo custo e fácil metodologia, sendo muito utilizado em modelos experimentais com coelhos^(19, 24-26, 133) e ratos⁽¹³⁴⁾.

Com o objetivo de padronizar e poder comparar os dados entre os diversos centros ao redor do mundo, o Comitê Internacional de Estandartização do Eletrorretinograma recomenda um protocolo que foi publicado, em 1989, e atualizado, em 1994^(119, 121, 135, 136), em 2004⁽¹²²⁾ e, em 2008⁽¹²⁰⁾.

O protocolo consiste de uma sequência de testes, a fim de obter cinco respostas básicas demonstradas a seguir⁽¹²⁰⁾:

1. Resposta Escotópica (0,01 cd.s/ m² ERG adaptado ao escuro, estímulo branco fraco, resposta dos bastonetes)
2. Resposta Escotópica Máxima (3,0 cd.s/ m² ERG adaptado ao escuro, estímulo branco forte, resposta máxima cones e bastonetes)
3. Registros dos potenciais oscilatórios (3,0 cd.s/ m² ERG adaptado ao escuro)
4. Resposta Fotópica (3,0 cd.s/ m² ERG adaptado à luz, estímulo branco forte, resposta dos cones a um único flash)
5. *Flicker* 30 Hz (3,0 cd.s/ m² ERG adaptado à luz, resposta dos cones ao estímulo repetido)

Uma importante diferença na realização do ERG em humanos e em animais é que nos animais é necessário o uso de anestésicos. Entretanto, como todos os

anestésicos afetam a neurotransmissão, afetam também o ERG ^(137, 138). Por esta razão, é fundamental usar o mesmo protocolo de anestesia em todos os estudos para se obter resultados comparáveis e reprodutíveis.

Na literatura, é muito difícil a comparação dos resultados de ERGs em coelhos pela grande variabilidade de metodologia, como a utilização de diferentes tipos de eletrodos, diferentes protocolos anestésicos, diferentes intensidades luminosas. Outros fatores que podem influenciar são: a idade e a temperatura corporal do animal. Coelhos jovens, com menos de 3 meses de idade apresentam amplitude da onda **b** menores do que coelhos mais velhos (15 a 27 meses) ⁽¹³²⁾. Se a temperatura do animal diminuir muito, poderá levar à diminuição do metabolismo geral, diminuindo a intensidade de reações químicas e a amplitude do ERG em ratos e coelhos ^(139, 140).

1.6.2.3 Estudos histopatológicos

Microscopia Óptica

A microscopia óptica (LM) é o método mais utilizado para análise morfológica nos estudos de biocompatibilidade retiniana, seguida de técnicas mais sofisticadas como: imuno-histoquímica, microscopia eletrônica e microscopia confocal ⁽⁹⁸⁾.

Fixadores são utilizados para preservar o tecido, as estruturas celulares e as organelas celulares, e o mais comumente utilizado é o formaldeído tamponado a

10%. É importante considerar que o fixador não deve ser tóxico para o indivíduo que o manuseia nem deve causar dano ao tecido que está sendo preservado.

O processamento envolve a desidratação do tecido com xylol e posterior impregnação na parafina. O tecido é então seccionado em cortes semifinos (2-8 micrometros) utilizando um micrótomo. Estes cortes são colocados em uma lâmina e são corados, os corantes mais utilizados são a hematoxilina e eosina (H&E) e o azul de toluidina.

Para a análise da LM é essencial o conhecimento da morfologia normal do tecido que será analisado, cujo método pode ser descritivo e analítico. O descritivo é o mais utilizado na literatura, neste o autor, descreve se o tecido está normal ou não, e o tipo de alteração encontrada. Estudos descritivos são mais simples, e as amostras podem ser menores. Estudos analíticos requerem um grande número de animais e um método mais elaborado de análise. A análise morfométrica pode ser realizada por meio da contagem celular ou pela medida de cada camada celular para comparação ⁽⁹⁸⁾.

Microscopia eletrônica

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é a técnica microscópica, no qual um feixe de elétrons é transmitido através de um tecido ultrafino, interagindo com este à medida que passa por ele. Uma imagem é formada e magnificada em uma lente objetiva e aparece na tela fluorescente.

O fixador utilizado é o glutaraldeído, que penetra rapidamente e estabiliza as proteínas, mas não fixa os lipídios. O segundo fixador, é o tetróxido de osmium que reage com os lipídios e age como corante.

Existem algumas desvantagens da técnica da TEM, como a dificuldade na obtenção e preparo do material, para que seja fino o suficiente para ser elétron transparente. O tempo dispendido para a análise da TEM é longo, e outra desvantagem é que a amostra não pode ser analisada com imuno-histoquímica, uma vez que foi fixada em glutaraldeído⁽⁹⁸⁾.

É importante lembrar que a TEM deve ser usada, como um adjunto na análise histológica, não deve ser utilizada sozinha porque representa apenas uma pequena amostra do tecido retiniano, diferente da visão global da microscopia óptica.

1.6.2.4 Avaliação clínica

O exame ocular pode ser realizado imediatamente antes da injeção da droga e avaliado no período pós-injeção; inclui a biomicroscopia realizada na lâmpada de fenda e a oftalmoscopia indireta sob midríase. O objetivo é identificar efeitos adversos tóxicos como: inflamação ocular na forma de células e *flare* na câmara anterior, presença de hipópio, celularidade e opacidade vítrea, além da formação de catarata. Na oftalmoscopia, devem ser avaliados: o aspecto da retina, a presença de descolamento, hemorragia, opacidades e alterações pigmentares^{(26) (19) (24) (141)}.

1.7 INJEÇÕES INTRAVÍTREAS

Atualmente as injeções intravítreas são uma importante forma de tratamento muito utilizada nas várias doenças da retina. Como as medicações de uso tópico e sistêmico não atingem níveis terapêuticos suficientes no segmento posterior, as injeções intravítreas constituem a melhor forma para atingir esses níveis ^{(142) (143)}.

A baixa penetração intravítrea pode ser explicada em parte pelas firmes junções das células do epitélio pigmentado da retina e pelas células endoteliais das paredes dos capilares retinianos que formam a chamada barreira hematorretiniana. Esta barreira dificultaria a penetração das drogas na cavidade vítrea ^{(144, 145) (146)}. Sendo assim, a forma mais lógica de ultrapassar as barreiras fisiológica e anatômica e atingir concentrações vítreas satisfatórias rapidamente seria por meio de injeções intravítreas ⁽¹⁴⁷⁾.

O primeiro relato de injeção intravítrea foi realizado por Ohm, em 1911. Ar foi injetado na cavidade vítrea para o tratamento de um caso de descolamento de retina ⁽¹⁴⁸⁾.

O interesse pelas injeções intravítreas de medicamentos ocorreu em razão da extrema dificuldade e ineficácia do tratamento das endoftalmites. Antes do advento dos antibióticos intravítreos, os resultados do tratamento da endoftalmite eram muito limitados.

Entretanto, a injeção intravítrea medicamentosa deu-se apenas em 1940, com a injeção da penicilina para o tratamento da endoftalmite ^{(149) (150)}. Infelizmente na

época, a administração do medicamento era feita muito tardiamente, semanas após o início da infecção, sendo a maior parte das tentativas de tratamento ineficaz.

Em 1944, um modelo experimental de endoftalmite estafilocócica foi tratado com sucesso através da injeção intravítrea de penicilina ⁽¹⁵¹⁾. Outros estudos foram realizados na mesma época com resultados semelhantes ^{(150) (152)}. Mas em razão da ausência de estudos sobre a toxicidade das drogas intravítreas na retina, essa terapêutica caiu no descrédito por quase duas décadas.

Nas décadas de 1950 e 1960, o uso das injeções intravítreas era limitado às injeções de ar e de óleo de silicone para o tratamento do descolamento de retina ^{(153) (154)}.

Na década de 1970, as injeções intravítreas voltaram como uma importante forma de tratamento da endoftalmite ^(155, 156). Na época, já havia estudos sobre a dose segura e sobre a eficácia de vários antibióticos, como os aminoglicosídeos e as cefalosporinas ^{(157) (158)}. Desde 1982, tem sido consenso que a administração intravítrea de antibióticos é essencial na conduta terapêutica de pacientes com endoftalmite infecciosa ^{(159) (144, 145)}.

Em 1987, o primeiro relato de caso de injeção intravítrea de ganciclovir em um paciente com retinite por citomegalovírus secundária à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi publicado ⁽¹⁶⁰⁾. Em 1998, a injeção intravítrea do fomivirsen sodium (Vitravene®) foi a primeira medicação aprovada para uso intravítreo pelo *U.S Food and Drug Administration* (FDA), no tratamento da retinite por citomegalovírus ⁽¹⁶¹⁾.

Embora a injeção intravítrea de corticoide tenha sido avaliada em modelo experimental de inflamação no início de 1980 ^{(115) (162) (163)}, não existem relatos do uso de corticoide em seres humanos até os anos 90. Em 1991, Blankenship demonstrou que a dexametasona intravítrea foi bem tolerada, mas sem efeito terapêutico no tratamento da retinopatia diabética pós-vitrectomia ⁽¹⁶⁴⁾. Em um estudo piloto com pacientes com DMRI exsudativa, a injeção intravítrea de acetato de triancinolona foi bem tolerada ⁽¹⁶⁵⁾.

No final dos anos de 1990, novas indicações da injeção intravítrea foram a injeção do metotrexate para o tratamento do linfoma ocular ⁽¹⁶⁶⁾ e a injeção do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) para o tratamento da hemorragia submacular ⁽¹⁶⁷⁾.

Atualmente, as injeções intravítreas têm sido utilizadas para uma enorme variedade de doenças, como as inflamatórias, neovasculares e edematosas da retina.

Para esse fim, os principais medicamentos utilizados são: acetato de triancinolona e as novas drogas antagonistas do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). Ambos têm sido amplamente utilizados no tratamento do edema macular secundário a diversas doenças, como retinopatia diabética, oclusões venosas, uveítes, entre outras ^{(168) (169) (170, 171) (172, 173) (174)}. As injeções intravítreas dos antagonistas do VEGF, como Ranibizumabe e Bevacizumabe são atualmente o tratamento de escolha para a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), forma exsudativa ^{(175) (176) (177) (178)}.

Entretanto, as desvantagens das injeções intravítreas são: risco de complicações por ser um procedimento invasivo, meia-vida curta de algumas drogas e risco de toxicidade para a retina ⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾.

O conhecimento da anatomia do olho é essencial para realizar as injeções intravítreas. A agulha deve ser inserida perpendicularmente pela esclera na pars plana com a ponta voltada para o centro do globo, a fim de evitar o toque no cristalino. A técnica inadequada pode levar a complicações iatrogênicas, como catarata traumática em razão do toque no cristalino, roturas de retina que podem resultar em descolamento de retina, que necessitam de cirurgia ⁽¹⁸²⁾⁽¹⁸³⁾.

Durante a injeção, a pressão intraocular pode aumentar transitoriamente, levando à oclusão da artéria central da retina. Se isso ocorrer, o cirurgião deve realizar imediatamente uma paracentese de câmara anterior ⁽¹⁸²⁾⁽¹⁸³⁾.

A maior parte das complicações são transitórias e tratáveis, segundo uma revisão feita com 14.866 injeções intravítreas; mas deve ser dada atenção especial, à técnica correta de realização da injeção intravítrea, já que raros casos de endoftalmite, descolamento de retina e hemorragia intraocular podem resultar em perda visual grave ⁽¹⁸²⁾.

Em um estudo de revisão sobre injeção intravítrea, a prevalência de endoftalmite, incluindo os casos descritos como não infecciosos ou pseudoendoftalmite, foi de 0,9% (38/4.382) por olho e 0,3% (38/14.866) por injeção. Excluindo os casos relatados como não infecciosos ou pseudoendoftalmite, a prevalência foi de 0,5% (24/4.382) por olho e 0,2% (24/14.866) por injeção. A

prevalência de endoftalmite por olho associada aos antivirais foi de 1,3% e associada à triancinolona foi de 0,6%, excluindo casos não infecciosos ou pseudoendoftalmite ⁽¹⁸²⁾.

Em relação à incidência de endoftalmite após a injeção intravítrea de antiangiogênicos, um estudo retrospectivo com 2.789 injeções de bevacizumabe e 287 de ranibizumabe relatou dois casos de endoftalmite em cada grupo. Sendo a incidência de 0,07% de endoftalmite no grupo do bevacizumabe e de 0,7% no grupo do ranibizumabe. A incidência total de endoftalmite foi de 0,14% (4/2976) em todas as injeções intravítreas realizadas ⁽¹⁸⁴⁾.

Na literatura, estudos mostram a incidência de endoftalmite variando de 0,03% a 0,16% por injeção intravítrea de antiangiogênicos ^{(185) (186) (187) (188)}.

Sendo assim, as injeções intravítreas constituem uma importante forma de tratamento, permitem alcançar uma maior concentração local da droga com muito menos efeitos colaterais sistêmicos e com baixo risco de complicação ocular.

2 Objetivos

Avaliar a toxicidade do adalimumabe intravítreo nas diferentes doses (0,5 mg, 1 mg, 2,5 mg, 5,0 mg e 10 mg) para a retina de coelhos por meio de:

1. avaliação clínica
2. eletrorretinograma
3. avaliação histopatológica

3 Métodos

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental, prospectivo e randomizado, conduzido em coelhos.

3.2 LOCAL

Este estudo foi feito no Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

3.3 ADALIMUMABE

O antagonista do TNF alfa, adalimumabe (Humira® Abbott) foi obtido por meio de doação.

Esta medicação é fabricada pela Vetter Pharma- Fertigung GmbH, Ravensburg – Alemanha, e é importada e distribuída pela Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. O adalimumabe vem em uma seringa para injeção subcutânea, 40mg em 0,8ml.

A Humira® (adalimumabe) é fornecida sob a forma de solução estéril, livre de conservantes, para administração subcutânea. A solução de Humira® (adalimumabe) é límpida e incolor, com um pH de 5,2.

Cada seringa contém: adalimumabe 40 mg e excipientes 0,8 ml: manitol, ácido cítrico mono-hidratado, citrato de sódio, fosfato monossódico di-hidratado, fosfato dissódico di-hidratado, cloreto de sódio, polissorbato, água para preparações injetáveis.

Não há interesse comercial na medicação estudada.

3.4 DESENHO DO ESTUDO

Dia 0:

1. Oftalmoscopia indireta e biomicroscopia para descartar alterações prévias
2. Eletrorretinograma (ERG) pré -injeção
3. Injeções intravítreas

Dia 7:

1. Oftalmoscopia indireta e biomicroscopia

Dia 14:

1. Oftalmoscopia indireta e biomicroscopia
2. Eletrorretinograma pós-injeção
3. Sacrifício dos animais e enucleação dos olhos para histopatologia

3.5 ANIMAIS

Foram utilizados 30 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*. Os animais pesavam de 2 a 3 Kg, encontravam-se em bom estado geral de saúde, livre de ecto e endoparasitas, conforme as regras seguidas pelo biotério da Universidade de São Paulo. Durante todo o decorrer do trabalho, os coelhos foram tratados, de acordo com as normas da resolução do uso de animais de pesquisa da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais numeradas. A identificação de cada coelho foi feita na orelha direita com tinta insolúvel em água com numeração de 1 a 30, foram alimentados com ração e água, e o ciclo claro escuro foi respeitado.

3.6 FORMAÇÃO DE GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em cinco grupos de seis coelhos aleatoriamente; o grupo controle foi formado pelo olho esquerdo dos coelhos dos grupos 1 e 2. Os grupos constituíram-se da seguinte forma:

- Grupo 1: Composto por seis animais. O olho direito de cada animal recebeu injeção intravítrea de 0,5 mg/0,1 ml de adalimumabe, e o esquerdo de cada animal recebeu 0,1 ml de solução salina balanceada (BSS);
- Grupo 2: Composto por seis animais. O olho direito de cada animal recebeu injeção intravítrea de 1 mg/0,1 ml de adalimumabe, e o esquerdo de cada animal recebeu 0,1 ml de solução salina balanceada (BSS);

Grupo 3: Composto por seis animais. O olho direito de cada animal recebeu injeção intravítrea de 2,5 mg/0,1 ml de adalimumabe;

Grupo 4: Composto por seis animais. O olho direito de cada animal recebeu injeção intravítrea de 5 mg/0,1 ml de adalimumabe;

Grupo 5: Composto por seis animais. O olho direito de cada animal recebeu injeção intravítrea de 10 mg/0,2 ml de adalimumabe; e

Grupo Controle: Composto pelos olhos esquerdos dos animais dos grupos 1 e 2, que receberam 0,1 ml de solução salina balanceada (BSS).

3.7 MIDRIÁSE MEDICAMENTOSA

A midríase dos animais nos exames de oftalmoscopia indireta, eletrorretinografia e nas injeções intravítreas foi alcançada através da instilação de uma gota de colírio de tropicamida a 1% (Alcon®) duas vezes com intervalos de 5 minutos, pelo menos, 30 minutos, antes dos exames.

3.8 ANESTESIA DOS ANIMAIS

A anestesia e analgesia dos animais nos procedimentos que exigiram imobilização completa, foram atingidas através de injeções intramusculares de

cloridrato de quetamina (Ketamina Agener[®]) 100 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2% (Calmium[®]) 6,7 mg/kg, diluídas em água destilada estéril.

Foi instilada uma gota de colírio de cloridrato de proximetacaína a 0,5% (Visonest[®]) no intuito de se obter anestesia tópica 3 minutos, antes dos procedimentos.

3.9 TÉCNICA DA INJEÇÃO INTRAVÍTREA DE ADALIMUMABE NOS ANIMAIS

Todos os procedimentos foram realizados sob condições estéreis. Após anestesia tópica do olho a ser submetido às injeções, foi instilado colírio de iodopovidona a 5%, 5 minutos antes. Uma paracentese da câmara anterior foi realizada com uma agulha de 27 gauge, retirando 0,1ml de humor aquoso para reduzir a pressão intraocular e para minimizar o refluxo da droga, após a injeção. Foi realizada a injeção intravítrea utilizando uma agulha de 30 gauge a 2 mm posterior ao limbo, no meio da cavidade vítrea com o bisel da agulha voltado para cima em direção ao nervo óptico. Cinco diferentes doses de adalimumabe foram preparadas: 0,5 mg, 1,0 mg, 2,5 mg, 5,0 mg e 10 mg. Os animais foram divididos em cinco grupos (n=6). Cada concentração foi injetada no olho direito de cada animal do grupo, e 0,1ml de solução salina balanceada (BSS) foi injetada no olho contralateral dos coelhos dos grupos 1 e 2 (grupo controle). No grupo de 10 mg, foram realizadas duas paracenteses de câmara anterior (uma antes e uma após a injeção de 0,2 ml).

Após a injeção intravítrea foi realizada a oftalmoscopia indireta para verificar a perfusão da artéria central da retina e para descartar a possibilidade de iatrogenias.

Como o Adalimumabe (Humira®) vem em uma seringa para injeção subcutânea na apresentação de 40 mg/0,8 ml, em 0,1 ml temos 5 mg, sendo assim para conseguirmos uma concentração da droga de 10 mg tivemos de injetar 0,2 ml, o dobro do volume dos outros grupos. As demais concentrações foram obtidas por meio da diluição do adalimumabe com água destilada para injeção.

Figura 1 - Técnica de injeção intravítrea no olho do coelho

3.10 DESCRIÇÃO DO EXAME BIOMICROSCÓPICO E OFTALMOSCÓPICO INDIRETO

Os coelhos foram submetidos ao exame biomicroscópico com lâmpada de fenda modelo Haag Streit 900 (Berna, Suíça), adaptada com suporte para exame de

animais e oftalmoscopia indireta oftalmoscópio da marca Keeler (Londres, Reino Unido) e lente de +20 dioptrias da marca Nikon (Toquio, Japão).

A biomicroscopia e a oftalmoscopia indireta foram realizadas no início do estudo, no intuito de detectar possíveis alterações oculares que viessem a comprometer os resultados da pesquisa, e nos dias 7 e 14 após a injeção intravítrea.

Foram observados se os seguintes sinais oculares estavam presentes após as injeções intravítreas: injeção ciliar, hipópio, células inflamatórias na câmara anterior e vítreo anterior, formação de catarata, opacidades vítreas e aspecto da retina e do nervo óptico.

Figura 2 - Realização da oftalmoscopia indireta

3.11 DESCRIÇÃO DO EXAME ELETRORRETINOGRÁFICO

O ERG foi realizado um dia antes e 14 dias, após a injeção intravítrea de adalimumabe, respeitando as normas descritas pelo Comitê Internacional de Estandartização da Eletroretinografia Clínica aplicadas em Estudos Experimentais ⁽¹²²⁾.

Utilizou-se um fotoestimulador modelo Graff P. S. 22 (Quincy, EUA) dentro de uma esfera de Ganzfeld e eletrodos na lente de contato (GoldLens®) para a realização da eletroretinografia.

O Laboratório de Psicofisiologia Sensorial adquiriu um software (Placa National Instruments, I-Systems, Monocular Data Acquisition), desenvolvido no Jules Stein Eye Institute (UCLA, Los Angeles, USA) por Steven Nusinowitz (PhD, Professor Assistente de Oftalmologia/Laboratório de Fisiologia Visual). Os programas permitem controle digital da frequência e duração do estímulo, análise dos registros integrada ao Microsoft Excel 2007, visibilização de cada etapa do ERG e indexação dos parâmetros analisados (onda-**a**, onda-**b**).

Os animais foram anestesiados e tiveram suas pupilas dilatadas, conforme descrito anteriormente.

Antes do exame, os animais foram adaptados ao escuro por 1 hora. Para o registro eletrofisiológico, os animais foram devidamente acomodados dentro de uma gaiola de Faraday, de 60 cm x 60 cm, responsável por manter o estado de adaptação ao escuro e isolar devidamente da interferência de qualquer campo elétrico externo.

Os animais foram posicionados lateralmente sobre um anteparo, presos por duas cintas que impedem a movimentação e foram mantidos aquecidos por uma coberta. Cada um dos olhos do coelho recebeu pulsos de luz gerados por um estimulador GRASS (PS33 Plus) com intensidade e frequência controladas, apresentados em uma cúpula de Ganzfeld (LKC 2503B), dentro da gaiola de Faraday.

O eletrodo bipolar (GoldLens®- registro e referência) de lente de contato foi colocado sobre a córnea do coelho, após a instilação de colírio anestésico (Visonest®) e metilcelulose 2% (Ophthalmos®) e o eletrodo terra foi fixado na orelha com pasta condutiva para EEG (Biolink®).

A preparação e o manuseio do animal foram feitos sob fraca iluminação vermelha.

O olho esquerdo foi ocluído enquanto foi feito o exame no olho direito, para que ele mantivesse a adaptação ao escuro. As seguintes respostas foram gravadas: escotópica (resposta dos bastonetes), escotópica máxima (máxima resposta, cones + bastonetes) e após esperar 2 minutos de adaptação ao claro foram gravadas as respostas fotópica (resposta dos cones) e o *Flicker* de 30Hz.

O ERG realizado antes da injeção foi comparado com o ERG, após 2 semanas da injeção. As medidas do ERG foram então analisadas estatisticamente, baseadas nos valores de amplitude e tempo implícito das ondas **a** e **b**.

A amplitude da onda **a** é medida da linha de base ao pico negativo da onda **a**. A amplitude da onda **b** é medida do pico negativo da onda **a** ao pico da onda **b**. O

tempo implícito das ondas **a** e **b** é o tempo, a partir do estímulo luminoso até o pico da onda ⁽¹²⁰⁾.

Figura 3 - Coelho posicionado para a realização do eletroretinograma

3.12 TÉCNICA DE SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Inicialmente, os coelhos foram anestesiados, segundo a técnica descrita no item 3.8 e, em seguida, foram sacrificados com injeção endovenosa de pentobarbital sódico a 3% (Sigma®) na dosagem de 100mg/Kg injetado na veia marginal da orelha.

3.13 ESTUDO HISTOLÓGICO

O exame de microscopia óptica foi realizado com microscópio da marca Reichert (Colônia, Alemanha), acoplado a uma câmera fotográfica Nikon (Tóquio, Japão) e a microscopia eletrônica de transmissão foi realizada com microscópio da marca Zeiss, modelo EM 10 C/CR (Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera fotográfica Nikon (Tóquio, Japão).

O preparo das lâminas para a microscopia óptica e das telas para a microscopia eletrônica foi realizado no Departamento de Patologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor).

A avaliação histopatológica foi realizada pela Dra. Sylvia Regina Temer Cursino e pelo Dr. José Wilson Cursino. Estes pesquisadores não sabiam o que havia sido injetado. Todas as camadas retinianas com exceção do epitélio pigmentado da retina foram analisadas.

3.13.1 Coleta e preparo do material para microscopia óptica

Os olhos de todos os coelhos foram enucleados, identificados e fixados em uma solução de formaldeído a 10% durante 48 horas; os seguintes passos foram realizados:

- desidratação em solução de álcool com concentrações crescentes de 70% até absoluto, ocupando 2 horas cada etapa;

- clareamento (diafanização) com xylol por 40 minutos;
- inclusão em parafina entre 2 e 4 horas, na estufa;
- secção com micrótomo em cortes de 4 μ m;
- colocação das secções em lâminas;
- desparafinização;
- reidratação em soluções de álcool com concentrações decrescentes de soluto até 70%;
- coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE) e
- montagem com lamínula e Entelan (reagente para fixação da lâmina).

3.13.2 Coleta e preparo do material para a microscopia eletrônica

Um corte de tecido de 3 X 3 mm contendo retina, epitélio pigmentado da retina, coroide e esclera, foi retirado da região localizada imediatamente abaixo do meridiano horizontal e temporal ao meridiano vertical, e foi fixado em glutaraldeído. O corte foi preparado pelo método padronizado por Duarte et al. (1992) ⁽¹⁸⁹⁾, como é demonstrado a seguir:

- lavagem em tampão cacodilato 0,1M; pH 7,3 com sacarose a 2%;
- pós fixação em tetróxido de ósmio a 2% diluído em tampão s-collidina por 30 minutos;
- lavagem em tampão cacodilato (0,1 M pH 7,3);
- contraste com acetato de uranila a 5% em etanol a 50%;
- lavagem em etanol a 70%;

- desidratação em 2,2-dimethoxipropano acidificado com ácido clorídrico e com acetona 100%
- infiltração com acetona e resina, na proporção de 1:1;
- infiltração com resina pura;
- polimerização a 100° C;
- cortes ultrafinos (60 nm de espessura); e
- contraste com acetato de uranila saturada e citrato de chumbo;

O material foi então observado e fotografado no microscópio eletrônico.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas (amplitude e tempo implícito) foram representadas por média, desvio-padrão (D.P) e mediana.

Os grupos foram comparados em relação às medidas iniciais e após 14 dias da injeção intravítrea.

Foi utilizado o teste estatístico de Wilcoxon, que consiste em um teste não paramétrico para comparar dados pareados.

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$). Níveis descritivos (P) inferiores a este valor foram considerados significantes.

4 Resultados

4.1 ACHADOS CLÍNICOS

Não foram observados sinais inflamatórios na câmara anterior ou no segmento posterior nos dias 7 e 14 nos grupos: controle, 0,5 mg, 1,0 mg, 2,5 mg e 5,0 mg. Já no grupo de 10 mg, observamos injeção ciliar e reação inflamatória leve no 7º dia em três coelhos, com melhora no 14º dia.

Em nenhum dos grupos, foram observados hipópio, opacidades vítreas, catarata, hemorragia ou descolamento de retina.

4.2 ACHADOS ELETORRETINOGRÁFICOS

Os resultados do ERG de todos os grupos, antes da injeção foram comparados com o ERG, após a injeção de adalimumabe. As variáveis analisadas foram: amplitude e tempo implícito da onda **a** e da onda **b** para cada resposta do ERG (Escotópica, Escotópica Máxima, Fotópica e *Flicker*).

Os resultados obtidos estão nos dados das tabelas 1-16.

Para o grupo controle e para o grupo de 1mg, não houve diferença estatística entre as variáveis antes e após a injeção.

Para o grupo de 0,5 mg, foram observadas diminuição dos tempos implícitos das ondas **a** ($p=0,046$) e **b** ($p=0,044$) nas respostas escotópicas máximas do ERG (Tabelas 6 e 8). Em relação à resposta escotópica, houve também uma diminuição do tempo implícito da onda **b** ($p=0,028$, Tabela 4).

No grupo de 2,5 mg, houve aumento da amplitude da onda **b** na resposta escotópica ($p=0,046$, Tabela 3) e aumento do tempo implícito da onda **a** na resposta fotópica, após a injeção ($p=0,027$, Tabela 10).

Já no grupo de 5 mg, foram observadas diminuição do tempo implícito da onda **b** na escotópica máxima ($p=0,028$, Tabela 8) e aumento da amplitude da onda **b** na fotópica ($p=0,028$, Tabela 11). No *Flicker* de 30 Hz, observamos aumento da amplitude da onda, após a injeção ($p=0,028$, Tabela 13).

No grupo de 10 mg, houve diferença estatística apenas na diminuição da amplitude da onda **a** na resposta fotópica ($p=0,046$, Tabela 9).

Em relação à resposta fotópica negativa, observamos aumento da amplitude estatisticamente significante no grupo de 5 mg ($p=0,046$, Tabela 15) e diminuição do tempo implícito no grupo controle ($p=0,046$, Tabela 16).

Tabela 1 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da onda **a** na resposta escotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica amplitude (μV) onda a	controle	Pre	(8,41)	1,89	(7,93)	0,198
		pos	(7,56)	1,33	(7,61)	
	0,5 mg	Pre	(8,12)	2,36	(8,81)	0,463
		pos	(7,29)	1,60	(7,65)	
	1,0 mg	Pre	(7,27)	2,13	(7,35)	0,917
		pos	(7,45)	2,60	(7,93)	
	2,5 mg	Pre	(11,02)	5,82	(8,66)	0,917
		pos	(10,69)	6,82	(7,88)	
	5,0 mg	Pre	(9,08)	0,96	(8,94)	0,600
		pos	(8,48)	1,62	(8,55)	
	10,0 mg	Pre	(5,73)	1,01	(6,07)	0,173
		pos	(7,75)	3,43	(7,84)	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 2 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda **a** na resposta escotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica tempo implícito (ms) onda a	controle	Pre	16,52	2,15	16,44	0,069
		pos	15,10	2,44	15,46	
	0,5 mg	Pre	17,94	2,14	18,20	0,340
		pos	15,85	5,50	18,20	
	1,0 mg	Pre	16,11	4,12	17,03	0,833
		pos	16,70	1,91	16,83	
	2,5 mg	Pre	16,38	2,15	16,25	0,246
		pos	17,09	1,88	17,22	
	5,0 mg	Pre	18,66	0,77	18,40	0,115
		pos	16,83	2,11	16,64	
	10,0 mg	Pre	14,35	2,18	13,70	0,173
		pos	15,92	2,33	15,86	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 3 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da onda **b** na resposta escotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica amplitude (μV) onda b	controle	Pre	104,33	22,15	104,54	0,683
		Pos	102,13	19,95	108,50	
	0,5 mg	Pre	127,38	24,27	131,20	0,116
		Pos	105,90	22,54	108,19	
	1,0 mg	Pre	105,44	12,74	106,83	0,463
		Pos	96,88	25,40	87,59	
	2,5 mg	Pre	88,18	32,27	89,95	0,046
		Pos	101,79	40,45	110,79	
	5,0 mg	Pre	90,86	16,54	87,04	0,917
		Pos	91,41	12,17	92,60	
	10,0 mg	Pre	92,11	24,32	86,87	0,917
		Pos	90,05	11,85	88,04	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 4 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após a injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda **b** na resposta escotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica tempo implícito (ms) onda b	controle	Pre	42,10	3,29	41,10	0,484
		pos	41,68	3,38	41,88	
	0,5 mg	Pre	48,08	3,55	48,73	0,028
		pos	43,05	2,99	42,86	
	1,0 mg	Pre	47,29	5,01	48,93	0,599
		pos	46,25	3,77	45,79	
	2,5 mg	Pre	38,88	5,10	40,71	0,116
		pos	41,42	6,60	42,86	
	5,0 mg	Pre	48,27	5,07	47,36	0,917
		pos	48,34	6,46	48,53	
	10,0 mg	Pre	39,92	3,89	39,34	0,753
		pos	40,18	2,42	40,70	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 5 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da onda **a** na resposta escotópica máxima do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica Max amplitude (μV) onda a	controle	Pre	(40,33)	8,08	(39,74)	0,124
		Pos	(37,97)	6,68	(36,23)	
	0,5 mg	Pre	(42,76)	9,32	(40,58)	0,116
		Pos	(34,59)	6,30	(35,61)	
	1,0 mg	Pre	(32,50)	6,06	(30,15)	0,345
		Pos	(36,89)	7,03	(35,29)	
	2,5 mg	Pre	(41,99)	7,84	(41,35)	0,752
		Pos	(41,49)	7,18	(43,92)	
	5,0 mg	Pre	(34,70)	8,49	(33,91)	0,463
		Pos	(36,45)	4,75	(37,60)	
	10,0 mg	Pre	(32,10)	12,76	(31,83)	0,600
		Pos	(29,60)	6,22	(30,43)	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 6 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda **a** na resposta escotópica máxima do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica Max tempo implícito (ms) onda a	Controle	Pre	15,88	0,98	15,66	0,115
		Pos	15,46	0,43	15,46	
	0,5 mg	Pre	16,96	1,39	16,64	0,046
		Pos	15,33	0,91	15,46	
	1,0 mg	Pre	16,57	1,39	16,25	0,581
		Pos	16,05	0,49	15,86	
	2,5 mg	Pre	15,65	0,99	15,26	0,136
		Pos	16,83	1,88	16,83	
	5,0 mg	Pre	16,44	1,84	16,05	0,498
		Pos	15,98	0,91	16,05	
	10,0 mg	Pre	15,26	0,50	15,26	0,400
		Pos	14,81	0,80	14,87	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 7 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da onda **b** na resposta escotópica máxima do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica Max amplitude (μV) onda b	Controle	Pre	123,01	27,12	120,31	0,397
		Pos	116,94	24,47	119,69	
	0,5 mg	Pre	141,93	21,14	137,64	0,173
		Pos	116,67	20,08	121,26	
	1,0 mg	Pre	114,68	13,83	110,46	0,753
		Pos	122,99	30,59	109,98	
	2,5 mg	Pre	118,35	29,24	104,73	0,074
		Pos	126,68	25,74	117,98	
	5,0 mg	Pre	109,59	18,25	105,54	0,753
		Pos	108,17	15,78	116,52	
	10,0 mg	Pre	96,21	19,71	97,16	0,600
		Pos	89,87	15,70	90,09	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 8 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda **b** na resposta escotópica máxima do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Escotópica Max tempo implícito (ms) onda b	Controle	Pre	45,99	5,19	47,17	0,300
		Pos	44,26	8,35	41,69	
	0,5 mg	Pre	53,56	5,23	53,23	0,044
		Pos	46,38	7,67	44,62	
	1,0 mg	Pre	56,68	2,21	56,16	0,116
		Pos	53,95	5,08	52,25	
	2,5 mg	Pre	48,79	7,93	47,75	0,599
		Pos	45,47	2,94	45,60	
	5,0 mg	Pre	54,40	6,94	53,82	0,028
		Pos	44,49	9,44	43,25	
	10,0 mg	Pre	44,16	8,53	44,43	0,249
		Pos	41,94	11,41	36,01	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 9 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da onda **a** na resposta fotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Fotópica amplitude (μV) onda a	controle	Pre	(8,23)	1,54	(7,98)	0,925
		Pos	(8,27)	2,19	(8,21)	
	0,5 mg	Pre	(7,93)	0,78	(7,82)	0,600
		Pos	(7,69)	1,23	(8,00)	
	1,0 mg	Pre	(6,86)	0,61	(6,78)	0,600
		Pos	(6,50)	1,84	(5,92)	
	2,5 mg	Pre	(6,81)	0,56	(6,73)	0,344
		Pos	(7,44)	1,66	(7,12)	
	5,0 mg	Pre	(7,67)	0,79	(7,57)	0,116
		Pos	(9,44)	1,87	(9,67)	
	10,0 mg	Pre	(7,44)	1,51	(7,73)	0,046
		Pos	(6,34)	1,75	(6,59)	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 10 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito da onda **a** na resposta fotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Fotópica tempo implícito (ms) onda a	controle	Pre	14,17	1,16	14,29	0,937
		Pos	14,26	0,92	14,48	
	0,5 mg	Pre	12,72	1,96	12,53	0,786
		Pos	13,11	3,02	13,07	
	1,0 mg	Pre	13,05	0,85	13,12	0,343
		Pos	13,63	1,12	13,51	
	2,5 mg	Pre	11,74	1,02	11,74	0,027
		Pos	14,22	1,07	14,68	
	5,0 mg	Pre	13,63	2,67	13,70	0,273
		Pos	14,48	1,26	14,48	
	10,0 mg	Pre	14,03	1,04	13,90	0,893
		Pos	14,16	2,58	15,27	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 11 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da onda **b** na resposta fotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Fotópica amplitude (μV) onda b	controle	Pre	49,03	14,42	46,32	0,177
		Pos	54,19	11,39	52,33	
	0,5 mg	Pre	46,36	7,24	44,65	0,345
		Pos	51,11	12,53	48,96	
	1,0 mg	Pre	33,90	4,39	34,04	0,116
		Pos	45,91	14,01	44,17	
	2,5 mg	Pre	47,32	7,09	46,32	0,752
		Pos	47,35	11,51	49,73	
	5,0 mg	Pre	33,84	6,35	32,18	0,028
		Pos	48,06	7,37	47,70	
	10,0 mg	Pre	36,85	13,68	38,68	0,600
		Pos	37,93	6,69	37,86	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 12 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda **b** na resposta fotópica do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
Fotópica tempo implícito (ms) onda b	controle	Pre	32,60	1,63	33,08	0,395
		Pos	32,09	1,67	31,70	
	0,5 mg	Pre	33,66	2,57	33,86	0,075
		Pos	31,05	1,23	31,12	
	1,0 mg	Pre	33,53	2,20	33,27	0,068
		Pos	32,81	1,91	33,07	
	2,5 mg	Pre	32,75	0,95	32,88	0,414
		Pos	33,20	1,85	32,88	
	5,0 mg	Pre	31,64	1,34	31,12	0,345
		Pos	32,62	1,56	32,68	
	10,0 mg	Pre	31,51	2,74	30,53	0,686
		Pos	31,38	2,54	30,92	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 13 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da onda no *Flicker* 30 Hz do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
<i>Flicker</i> 30 Hz Amplitude (μV)	controle	Pre	21,63	5,47	20,17	0,177
		Pos	24,22	6,81	23,48	
	0,5 mg	Pre	19,39	8,30	16,98	0,345
		Pos	22,80	4,95	21,09	
	1,0 mg	Pre	15,65	6,91	12,93	0,600
		Pos	17,40	3,77	16,82	
	2,5 mg	Pre	26,09	6,58	25,41	0,344
		Pos	24,17	9,96	24,55	
	5,0 mg	Pre	16,15	3,17	15,30	0,028
		Pos	23,98	5,25	22,70	
	10,0 mg	Pre	16,92	8,13	13,80	0,753
		Pos	16,67	5,70	15,53	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 14 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da onda no *Flicker* 30 Hz do ERG

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
<i>Flicker</i> 30Hz tempo implícito (ms)	controle	Pre	28,77	2,15	28,18	0,916
		Pos	28,26	0,87	28,18	
	0,5 mg	Pre	30,34	3,09	29,36	0,463
		Pos	28,70	1,81	28,38	
	1,0 mg	Pre	29,94	4,21	28,18	0,058
		Pos	27,40	0,78	27,40	
	2,5 mg	Pre	28,64	1,39	28,57	0,498
		Pos	29,03	1,15	28,96	
	5,0 mg	Pre	28,31	0,77	28,38	0,093
		Pos	29,87	1,62	29,16	
	10,0 mg	Pre	31,18	5,46	28,57	0,462
		Pos	33,40	4,78	35,43	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 15 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos da amplitude (μV) da resposta fotópica negativa (PhNR)

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
PhNR Amplitude (μV)	controle	Pre	(26,11)	8,73	(25,78)	0,975
		Pos	(28,35)	11,77	(25,57)	
	0,5 mg	Pre	(25,72)	6,80	(24,53)	0,917
		Pos	(27,42)	7,87	(25,45)	
	1,0 mg	Pre	(17,36)	5,51	(16,44)	0,116
		Pos	(23,52)	9,97	(20,08)	
	2,5 mg	Pre	(22,79)	5,31	(20,43)	0,753
		Pos	(22,17)	3,95	(21,61)	
	5,0 mg	Pre	(17,27)	4,51	(15,86)	0,046
		Pos	(24,52)	7,51	(23,39)	
	10,0 mg	Pre	(21,83)	10,09	(22,89)	0,917
		Pos	(20,91)	6,58	(20,63)	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 16 - Média, desvio-padrão e mediana pré e após 14 dias da injeção intravítrea de adalimumabe, para todos os grupos do tempo implícito (ms) da resposta fotópica negativa (PhNR)

Variável	Grupo	Tempo	Média	Dp	Mediana	P
PhNR tempo implícito (ms)	controle	Pre	69,53	4,72	68,68	0,046
		Pos	66,39	5,01	66,92	
	0,5 mg	Pre	71,55	4,31	70,25	0,173
		Pos	65,88	4,64	65,16	
	1,0 mg	Pre	72,01	3,21	71,62	0,588
		Pos	71,22	5,28	71,43	
	2,5 mg	Pre	69,86	3,22	69,86	0,463
		Pos	72,47	5,42	72,80	
	5,0 mg	Pre	73,77	4,82	74,75	0,249
		Pos	70,51	3,73	70,64	
	10,0 mg	Pre	70,51	2,26	69,86	0,753
		Pos	69,93	1,91	69,66	

FONTE: Laboratório da Visão do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Gráfico 1 - Perfil médio das respostas do ERG do grupo de controle, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe

Gráfico 2 - Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 0,5mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe

Gráfico 3 - Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 1,0mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe

Gráfico 4 - Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 2,5mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe

Gráfico 5 - Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 5mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe

Gráfico 6 - Perfil médio das respostas do ERG do grupo de 10mg, antes e após 2 semanas da injeção de adalimumabe

4.3 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

4.3.1 Microscopia Óptica

O exame de microscopia óptica dos olhos de todos os grupos não apresentou sinais de dano retiniano (Figuras 4 a 9). A arquitetura da retina mostrou-se preservada, sem evidências de desalinhamento ou rarefação celular. Entretanto, houve descolamento da retina e edema artefactual com vacúolos nas camadas internas da retina na grande maioria dos olhos, inclusive nos olhos do grupo controle (Figura 4), provavelmente, consequente à técnica de fixação ou processamento.

Figura 4 - Microscopia óptica de retina do grupo controle. A arquitetura da retina está preservada. Nota-se edema das camadas internas (seta) e descolamento de retina artefactual (hematoxilina & eosina, magnificação 20X)

Figura 5 - Microscopia óptica de retina do grupo de 0,5mg. A arquitetura da retina está preservada. Nota-se edema das camadas internas (seta) e descolamento de retina artefactual (hematoxilina & eosina, magnificação 20X)

Figura 6 - Microscopia óptica de retina do grupo de 1mg. A arquitetura da retina está preservada. Nota-se edema das camadas internas (seta) e descolamento de retina artefactual (hematoxilina & eosina, magnificação 20X)

Figura 7- Microscopia óptica de retina do grupo de 2,5mg. A arquitetura da retina está preservada. Nota-se edema das camadas internas (seta) e descolamento de retina artefactual (hematoxilina & eosina, magnificação 20X)

Figura 8 - Microscopia óptica de retina exposta a 5mg de adalimumabe. A arquitetura da retina está preservada. Nota-se edema das camadas internas com vacúolos (seta) e descolamento de retina artefactual (hematoxilina & eosina, magnificação 20X)

Figura 9 - Microscopia óptica de retina exposta a 10mg de Adalimumabe. A arquitetura da retina está preservada. Nota-se a presença de vacúolos (seta) na camada nuclear interna (hematoxilina & eosina, magnificação 20X)

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os olhos estudados não apresentaram alteração ultraestrutural da retina até o grupo de 5 mg. Infelizmente, os resultados do grupo de 10 mg foram prejudicados por falha na confecção das telas para a microscopia eletrônica.

Figura 10 - Microscopia eletrônica da retina de um coelho do grupo de 5mg. Segmentos externos e internos dos fotorreceptores normais. Disposição homogênea das mitocôndrias no interior dos segmentos internos (acetato de uranila e citrato de chumbo, 2550X)

Figura 11 - Microscopia eletrônica da retina de um coelho do grupo de 5mg. Segmentos externos com paredes regulares e disposição simétrica (acetato de uranila e citrato de chumbo, 6200X)

5 Discussão

O presente estudo não mostrou sinais clínicos, funcionais ou histopatológicos de toxicidade do adalimumabe até a dose de 5mg. Mas no grupo de 10 mg foram observadas algumas alterações clínicas e eletrorretinográficas leves.

Em relação aos achados clínicos, três olhos do grupo de 10mg apresentaram reação inflamatória leve, provavelmente em razão de maior manipulação, uma vez que foi injetado 0,2ml e foram realizadas duas paracenteses de câmara anterior para normalizar a pressão intraocular e prevenir o refluxo da droga. Mas não se pode descartar totalmente a hipótese de que seja um sinal inicial de toxicidade intraocular do adalimumabe. Entretanto, a reação inflamatória era leve e houve melhora, após uma semana. Não foram observados em nenhum dos olhos hipópio, vitreíte, catarata, hemorragia ou descolamento da retina.

Os achados eletrorretinográficos que normalmente indicam alteração funcional da retina são a redução da amplitude das ondas **a** e **b** e o aumento do tempo implícito das ondas **a** e **b**. A redução da amplitude da onda **b** é a manifestação eletrorretinográfica observada com mais frequência nos estudos sobre toxicidade retínica de drogas, como cetoconazol ⁽¹⁹⁰⁾, miconazol ⁽¹⁹¹⁾, vancomicina ⁽¹⁸⁾, claritromicina ⁽¹⁹²⁾, espartanamicina B ⁽¹⁹³⁾ entre outras.

No entanto, em nenhum grupo, mesmo com a máxima dose, houve redução da amplitude da onda **b**.

No grupo de 5 mg, observamos diminuição do tempo implícito da onda **b** na resposta escotópica máxima, aumento da amplitude da onda **b** na resposta fotópica e aumento da amplitude da onda no *flicker*.

No grupo de 10mg, houve diminuição da amplitude da onda **a** na resposta fotópica, esta diminuição embora possa indicar alteração inicial da função dos fotorreceptores, não é a hipótese mais provável. Isto porque de todas as variáveis estudadas: amplitude das ondas **a** e **b** e tempo implícito das ondas **a** e **b**, para o ERG escotópico, escotópico máximo, fotópico e *flicker*, houve alteração estatisticamente significativa em apenas uma variável. A hipótese mais provável é que esta diferença estatística seja em decorrência do tamanho pequeno da amostra.

Além disso, as alterações observadas no ERG não são doses dependentes e, provavelmente, não possuam significado clínico.

Os exames necessários para avaliar a função da camada de células ganglionares ou das fibras nervosas da retina são a resposta fotópica negativa (PhNR) e o Potencial Visual Evocado (PVE) ⁽¹¹²⁾.

No presente estudo, foi calculada a resposta fotópica negativa para todos os grupos e comparada antes e depois de 2 semanas da injeção intravítrea de adalimumabe. Não houve diminuição da amplitude da resposta fotópica negativa (PhNR) em nenhum dos grupos. No grupo de 5 mg, houve aumento na resposta após a injeção de adalimumabe. A PhNR é um potencial elétrico originado nas células ganglionares da retina e seus axônios e reflete a função da retina interna. Estudos recentes mostram que a PhNR encontra-se diminuída em doenças oculares que afetam a camada de células ganglionares, como glaucoma, retinopatia diabética e

oclusão de artéria central da retina^{(127) (128) (129) (130)}. Neste estudo, o adalimumabe não mostrou sinais de toxicidade para a camada de células ganglionares dos coelhos.

Em relação aos achados histopatológicos, foi observada preservação da arquitetura da retina em todas as doses estudadas. No entanto, como em todos os olhos, inclusive nos controles, foram evidenciados edema e vacuolização das camadas internas da retina, estas alterações foram atribuídas a artefato de técnica. Estes artefatos podem ser decorrentes da preservação do material estudado ou da maneira pela qual foram feitos os cortes macroscópicos e microscópicos, cortes oblíquos podem causar falsa impressão de edema e ou vacuolização celular.

Outro fator ao qual se deve ficar atento é que embora a histologia esteja normal, às vezes, o dano estrutural visível pode demorar a aparecer. Por isso, os testes funcionais ERG e PVE são superiores para detectar efeitos tóxicos a curto prazo. Sendo assim, podemos obter testes funcionais indicando comprometimento da função da retina mesmo com a morfologia da retina intacta^(112, 193).

Na microscopia eletrônica, os achados também não indicaram dano para a retina em nenhum grupo estudado até a dose de 5 mg. Infelizmente, os achados do grupo de 10 mg foram inconclusivos pela falha na confecção das telas.

O presente estudo mostrou resultados semelhantes ao estudo de Tsilimbarets et al. publicado, em 2009, no qual 16 coelhos foram divididos em dois grupos, um recebeu 0,5 mg de adalimumabe intravítreo e o outro, 5 mg. Foram realizados ERG, antes das injeções e após 2 semanas. As seguintes respostas do ERG foram analisadas: escotópica, fotópica e *flicker*. Não foram encontrados sinais clínicos de toxicidade em nenhuma das concentrações. O ERG não mostrou alterações nas

amplitudes (não foram estudados os tempos implícitos) e a morfologia (LM e TEM) também se apresentava normal, sem sinais de toxicidade ⁽²⁸⁾.

Nossos resultados atuais diferem muito dos resultados obtidos em um estudo piloto que realizamos na Tulane University, New Orleans, EUA, publicado em 2008 ⁽²⁷⁾. Neste estudo piloto, avaliamos a toxicidade intravítrea do adalimumabe nas seguintes concentrações: 0,25 mg, 0,5 mg e 1,0 mg. No entanto, era uma amostra bastante pequena, apenas três olhos em cada grupo. Observamos sinais de toxicidade em dois dos três olhos do grupo de 1mg. Houve intensa diminuição das respostas do ERG e alterações histológicas nos dois olhos, inclusive um olho apresentava necrose da retina ⁽²⁷⁾.

Uma possibilidade é que esses dois coelhos tenham apresentado algum tipo de reação imunogênica ao adalimumabe, desencadeando um quadro de intensa inflamação intraocular. Mas, como o adalimumabe é um anticorpo totalmente humano, é muito raro desencadear reação alérgica em seres humanos, mas em coelhos esta é uma possibilidade. Diferente do infliximabe, que é um anticorpo de origem murina, que sabidamente desencadeia reações alérgicas graves em 5% dos casos quando administrado de modo sistêmico em pacientes ^{(92) (93)}. Normalmente quando o infliximabe é utilizado em infusões endovenosas para o tratamento de doenças sistêmicas, o methotrexate é administrado concomitante a fim de diminuir a chance de reações imunogênicas ⁽⁷⁾.

Isso ocorre porque o infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico, composto em 35% de proteínas derivadas do rato e 65% de proteínas humanas. Alguns anticorpos monoclonais foram humanizados para incorporar mais proteínas humanas à sua estrutura, como é o caso do bevacizumabe (Avastin®) e do

ranibizumabe (Lucentis®), que contém 95% de moléculas humanas. Entretanto, o Adalimumabe é um anticorpo monoclonal composto só de peptídeos humanos.

Em um estudo piloto com seres humanos, quatro pacientes foram tratados com injeção intravítrea de infliximabe (0,5mg). Dois apresentavam edema macular diabético refratário, e os outros dois DMRI exsudativa. Todos mostraram redução das respostas do ERG e da microperimetria. Um paciente desenvolveu panuveíte, após a segunda injeção e dois apresentaram vitreíte, após a primeira injeção. Além disso, três pacientes, desenvolveram anticorpos sistêmicos contra o infliximabe (anticorpos humanos anti quiméricos). No estudo, o infliximabe não se mostrou seguro, sendo imunogênico e, provavelmente, retinotóxico ⁽¹⁸¹⁾.

É importante lembrar que neste estudo foi utilizada a dose de 0,5 mg/0,05 ml de infliximabe, dose esta muito inferior à considerada segura nos estudos experimentais realizados em coelhos, nos quais a dose segura foi de 2 mg ⁽²³⁾, e em outro estudo, foi 1,7 mg ⁽¹⁹⁴⁾. Considerando que o volume vítreo do coelho é em média 1,5 ml ⁽¹¹⁵⁾, e o do olho humano é de 4 ml, a dose segura de infliximabe intravítreo seria de 5 mg ⁽¹⁹⁵⁾.

Em outro estudo com infliximabe intravítreo, três pacientes com DMRI exsudativa não responsiva ao tratamento com Ranibizumabe (Lucentis®) foram tratados com uma dose maior, 2 mg e não apresentaram efeitos adversos. Os pacientes receberam duas injeções intravítreas de infliximabe (com intervalos de 2 e 3 meses) e apresentaram melhora da acuidade visual e diminuição da espessura central da retina ⁽¹⁹⁵⁾.

Outra possível justificativa para explicar a diferença nos resultados obtidos quando comparamos com o estudo piloto, seria a presença de contaminantes que teriam desencadeado a intensa reação inflamatória nos dois olhos de maior dose do estudo piloto.

É importante notar que a maior parte dos compostos administrados através de injeções intravítreas não foram aprovados para esse propósito. Até agora apenas o formivirsen, o pegaptanibe sódico e o ranibizumabe foram aprovados para uso intravítreo. Os agentes formulados para outras vias de administração podem conter formulações subótimas do composto terapêutico, pH impróprio ou podem conter níveis inaceitáveis de contaminantes, como a endotoxina. A endotoxina é um componente da parede celular das bactérias que está comumente presente durante o processo de manufatura farmacêutica, e pode causar reação inflamatória grave quando injetada no vítreo ⁽¹⁹⁶⁾.

A endotoxina é um contaminante comum de materiais cirúrgicos oftalmológicos, como a substância viscoelástica e, até mesmo, água destilada e reservatórios estéreis podem conter níveis de endotoxina suficientes para provocar inflamação intraocular grave ⁽¹⁹⁷⁾. Contaminação de instrumentos cirúrgicos com endotoxina também foram associadas à ceratite lamelar difusa pós cirurgia refrativa ⁽¹⁹⁸⁾.

Contaminantes particulados presentes na medicação, seringa ou qualquer outro material utilizado na hora da injeção também têm o potencial de induzir inflamação quando injetados no vítreo. Isto tem sido demonstrado nos casos de lubrificantes de luvas ⁽¹⁹⁹⁾ e de seringas ⁽¹⁸⁰⁾ que podem causar intensa reação inflamatória. Nenhum talco presente nas luvas é totalmente seguro, até mesmo

pequena quantidade de talco (10 microgramas) pode desencadear resposta inflamatória⁽¹⁹⁹⁾.

Ness T et al. publicaram 11 casos de vitreíte tóxica grave após injeção intravítrea de bevacizumabe (Avastin®) que atribuíram à seringa utilizada. O êmbolo da seringa era lubrificado com óleo de silicone para diminuir a fricção; assim, foram encontradas gotas de óleo de silicone no vítreo anterior de pacientes semanas a meses, após a injeção. Quando trocaram a marca da seringa, não observaram novos casos de vitreíte tóxica⁽¹⁸⁰⁾.

Stepien et al. publicaram recentemente 27 casos de endoftalmite asséptica, após injeção intravítrea de triamcinolona, na qual a etiologia da reação tóxica foi o conservante⁽²⁰⁰⁾.

O primeiro estudo piloto com injeções intravítreas de adalimumabe em pacientes foi publicado recentemente, cujo objetivo foi avaliar a eficácia e segurança do adalimumabe intravítreo no tratamento do edema macular cistoide secundário à uveíte não infecciosa. Foram avaliados oito pacientes com EMC crônico refratário ao tratamento com corticoide. Entretanto, apenas cinco pacientes completaram o seguimento de 6 meses. Os pacientes receberam injeções mensais de adalimumabe, 0,5 mg/0,05 ml nos primeiros 3 meses e quando houve piora da AV maior do que cinco letras ou aumento da espessura foveal maior do que 100µm foi injetada uma dose maior de 1,0 mg/0,05 ml. Nenhum efeito adverso sistêmico ou ocular foi observado durante o estudo. Nenhum paciente apresentou progressão da catarata ou inflamação ocular. Porém, não houve melhora da acuidade visual ou melhora anatômica em nenhum dos olhos⁽²⁰¹⁾. Uma possibilidade é que a dose utilizada tenha sido baixa e, por isso, sem eficácia.

Alguns pesquisadores têm atribuído diferentes resultados de toxicidade à fatores não relacionados com a droga em si, e sim a seu pH, osmolaridade e toxicidade do conservante ^(179, 202).

Marmor, em 1979, foi o primeiro autor a relatar alterações de toxicidade para a retina secundária à alteração na osmolaridade da interface vitreoretiniana. Foi descrito dano celular com alteração da arquitetura celular causada por uma osmolaridade superior a 500 mOsm ⁽²⁰³⁾. Apesar das diferenças na osmolaridade entre o espaço sub-retiniano e a coroide serem corrigidas rapidamente pelos tecidos adjacentes, substâncias com osmolaridade não fisiológicas podem provocar dano quando em contato com o espaço sub-retiniano, como na cirurgia do buraco macular. Injeções intravítreas podem alterar rapidamente a osmolaridade na cavidade vítrea. Vários estudos *in vivo* e *in vitro* propuseram que a indocianina verde hipo-osmótica pode ser prejudicial para o EPR, e esse efeito pode aumentar com a exposição à luz durante a cirurgia ^{(202) (107)}.

As condições homeostáticas são essenciais para o delicado meio intraocular, e as várias medicações utilizadas *off-label* atualmente não possuem o pH e a osmolaridade ideais. Entretanto, a falta de valores seguros definidos de pH e osmolaridade na literatura dificultam mais ainda prever se determinada formulação é ou não tóxica. Mas é óbvio que valores extremos de pH e osmolaridade para soluções intraoculares devem ser definitivamente evitadas.

Segundo comunicação pessoal do professor Armando da Silva Cunha Junior (professor titular de farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais), o pH de produtos de uso intraocular deve ficar entre 5 e 7,8. A osmolaridade pode variar

entre iso (290-300 mOsm) e hiperosmótico, pois o volume administrado é pequeno e a diluição impede que, no caso de produtos hiperosmóticos, ocorram danos celulares.

O adalimumabe é uma solução isosmótica, possui um pH de 5,2 e não apresenta conservantes, características estas dentro do recomendado para uso intraocular.

Nosso estudo evidenciou que a injeção intravítrea de adalimumabe não mostrou sinais de toxicidade para a retina de coelhos até uma concentração de 5 mg. No entanto, não foram avaliados efeitos a longo prazo, nem foram estudados olhos com inflamação ativa, que podem ser mais susceptíveis à toxicidade das drogas, sugerindo que novas pesquisas devam ser realizadas.

Para diminuir os efeitos adversos sistêmicos dos anti-TNF- α e aumentar a concentração intraocular, a injeção intravítrea desses medicamentos é uma possível alternativa terapêutica.

Nas doenças oculares, o papel dos antagonistas do TNF- α ainda não está totalmente esclarecido. Estudos experimentais e clínicos mostram resultados promissores, mas são necessários novos estudos para estabelecer a segurança e a melhor indicação de cada um desses medicamentos.

6 Conclusões

1. **Avaliação clínica:** não houve alteração em nenhum dos olhos até a dose de 5mg. Reação inflamatória leve foi observada em três dos seis olhos do grupo de 10mg no sétimo dia após a injeção.
2. **Eletrorretinograma:** não houve diminuição da amplitude das ondas **a** e **b** em nenhuma resposta do ERG até a dose de 5mg. No grupo de 10mg, foi observada diminuição da onda **a** na resposta fotópica do ERG.
3. **Avaliação histopatológica:** a microscopia óptica mostrou-se normal para todos os grupos estudados. Na microscopia eletrônica, não foram observadas alterações até a dose de 5mg.

7 Anexos

Anexo 1 - Resposta Escotópica (amplitudes e tempos implícitos das ondas a e b) antes e 14 dias após a injeção de adalimumabe

Anexo 2 - Resposta Escotópica Máxima (amplitudes e tempos implícitos das ondas a e b) antes e 14 dias após a injeção de adalimumabe

Anexo 3 - Resposta Fotópica (amplitudes e tempos implícitos das ondas a e b) antes e 14 dias após a injeção de adalimumabe

Anexo 4 - Flicker 30 Hz (amplitudes e tempos implícitos) antes e 14 dias após a injeção de adalimumabe

8 Referências

1. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *Jama*. 2006;295(19):2275-85.
2. Braun J, de Keyser F, Brandt J, Mielants H, Sieper J, Veys E. New treatment options in spondyloarthropathies: increasing evidence for significant efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13(4):245-9.
3. Braun J, Sieper J. Biological therapies in the spondyloarthritides--the current state. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43(9):1072-84.
4. Delaunay C, Farrenq V, Marini-Portugal A, Cohen JD, Chevalier X, Claudepierre P. Infliximab to etanercept switch in patients with spondyloarthropathies and psoriatic arthritis: preliminary data. *J Rheumatol*. 2005;32(11):2183-5.
5. Gordon KB, Langley RG, Leonardi C, Toth D, Menter MA, Kang S, et al. Clinical response to adalimumab treatment in patients with moderate to severe psoriasis: double-blind, randomized controlled trial and open-label extension study. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(4):598-606.
6. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology*. 2006;130(2):323-33; quiz 591.
7. Ardoin SP, Kredich D, Rabinovich E, Schanberg LE, Jaffe GJ. Infliximab to treat chronic noninfectious uveitis in children: retrospective case series with long-term follow-up. *Am J Ophthalmol*. 2007;144(6):844-9.

8. Bawazeer A, Raffa LH. Clinical experience with adalimumab in the treatment of ocular behcet disease. *Ocul Immunol Inflamm*. 2010;18(3):226-32.
9. Benitez-del-Castillo JM, Martinez-de-la-Casa JM, Pato-Cour E, Mendez-Fernandez R, Lopez-Abad C, Matilla M, et al. Long-term treatment of refractory posterior uveitis with anti-TNFalpha (infliximab). *Eye*. 2005;19(8):841-5.
10. Biester S, Deuter C, Michels H, Haefner R, Kuemmerle-Deschner J, Doycheva D, et al. Adalimumab in the therapy of uveitis in childhood. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(3):319-24.
11. Hale S, Lightman S. Anti-TNF therapies in the management of acute and chronic uveitis. *Cytokine*. 2006;33(4):231-7.
12. Manzano R, Carvounis P, Albini T, Holz E. Etanercept Monotherapy Induces Complete Resolution of Cystoid Macular Edema in a Patient with Refractory Intermediate Uveitis. *Retinal Cases and Brief Reports*. 2007;1:261-3.
13. Markomichelakis NN, Theodossiadis PG, Pantelia E, Papaefthimiou S, Theodossiadis GP, Sfikakis PP. Infliximab for chronic cystoid macular edema associated with uveitis. *Am J Ophthalmol*. 2004;138(4):648-50.
14. Markomichelakis NN, Theodossiadis PG, Sfikakis PP. Regression of neovascular age-related macular degeneration following infliximab therapy. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(3):537-40.
15. Armstrong D, Augustin AJ, Spengler R, Al-Jada A, Nickola T, Grus F, et al. Detection of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. *Ophthalmologica*. 1998;212(6):410-4.

16. May DR, Ericson ES, Peyman GA, Axelrod AJ. Intraocular injection of gentamicin. Single injection therapy of experimental bacterial endophthalmitis. *Arch Ophthalmol*. 1974;91(6):487-9.
17. Peyman GA. Antibiotic administration in the treatment of bacterial endophthalmitis. II. Intravitreal injections. *Surv Ophthalmol*. 1977;21(4):332, 9-46.
18. Pflugfelder SC, Hernandez E, Fliesler SJ, Alvarez J, Pflugfelder ME, Forster RK. Intravitreal vancomycin. Retinal toxicity, clearance, and interaction with gentamicin. *Arch Ophthalmol*. 1987;105(6):831-7.
19. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilecim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006;26(3):257-61.
20. Maia M, Penha FM, Farah ME, Dib E, Principe A, Lima Filho AA, et al. Subretinal injection of preservative-free triamcinolone acetonide and supernatant vehicle in rabbits: an electron microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(3):379-88.
21. Maia M, Margalit E, Lakhanpal R, Tso MO, Grebe R, Torres G, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina*. 2004;24(1):69-79.
22. Penha FM, Maia M, Farah ME, Dib E, Principe AH, Devin F, et al. Morphologic and clinical effects of subretinal injection of indocyanine green and infracyanine green in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2008;24(1):52-61.
23. Theodossiadis PG, Liarakos VS, Sfrikakis PP, Charonis A, Agrogiannis G, Kavantzias N, et al. Intravitreal administration of the anti-TNF monoclonal antibody infliximab in the rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(2):273-81.
24. Kivilecim M, Peyman GA, Kazi AA, Dellacroce J, Ghobrial RN, Monzano R. Intravitreal toxicity of high-dose etanercept. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2007;23(1):57-62.

25. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M, Chevez-Barrios P, Takahashi W. Testing intravitreal toxicity of rapamycin in rabbit eyes. *Arq Bras Oftalmol.* 2009;72(1):18-22.
26. Morales AM, Kivilcim M, Peyman GA, Main M, Manzano RP. Intravitreal toxicity of ketorolac tris salt and flurbiprofen. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2009;40(1):38-42.
27. Manzano RP, Peyman GA, Carvounis PE, Kivilcim M, Khan P, Chevez-Barrios P, et al. Ocular toxicity of intravitreal adalimumab (Humira) in the rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246(6):907-11.
28. Tsilimbaris M, Diakonis VF, Naoumidi I, Charisis S, Kritikos I, Chatzithanas G, et al. Evaluation of potential retinal toxicity of adalimumab (Humira). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(8):1119-25.
29. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):35-45.
30. Weisman MH, Moreland LW, Furst DE, Weinblatt ME, Keystone EC, Paulus HE, et al. Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a pilot study. *Clin Ther.* 2003;25(6):1700-21.
31. Mpofu S, Fatima F, Moots RJ. Anti-TNF-alpha therapies: they are all the same (aren't they?). *Rheumatology (Oxford).* 2005;44(3):271-3.
32. Wiedmann MW, Mossner J, Baerwald C, Pierer M. TNF alpha inhibition as treatment modality for certain rheumatologic and gastrointestinal diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2009;9(3):295-314.

-
33. Lim LL, Fraunfelder FW, Rosenbaum JT. Do tumor necrosis factor inhibitors cause uveitis? A registry-based study. *Arthritis Rheum.* 2007;56(10):3248-52.
34. Nash PT, Florin TH. Tumour necrosis factor inhibitors. *Med J Aust.* 2005;183(4):205-8.
35. Mease PJ. Certolizumab pegol in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of its clinical efficacy and safety. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Sep 25.
36. McCluggage LK, Scholtz JM. Golimumab: a tumor necrosis factor alpha inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Pharmacother.* 2010;44(1):135-44.
37. Abbas A, Lichtman A, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular.* Rio de Janeiro: Editora Revinter; 1998.p.254-76.
38. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996;334(26):1717-25.
39. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol.* 2001;19:163-96.
40. Sfikakis PP, Kollias G. Tumor necrosis factor biology in experimental and clinical arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(4):380-6.
41. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 1996;84(2):299-308.
42. Jasielska M, Semkova I, Shi X, Schmidt K, Karagiannis D, Kokkinou D, et al. Differential role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha receptors in the

development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(8):3874-83.

43. Shen Y, Li R, Shiosaki K. Inhibition of p75 tumor necrosis factor receptor by antisense oligonucleotides increases hypoxic injury and beta-amyloid toxicity in human neuronal cell line. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3550-3.

44. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*. 1995;269(5229):1424-7.

45. Planck SR, Huang XN, Robertson JE, Rosenbaum JT. Cytokine mRNA levels in rat ocular tissues after systemic endotoxin treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(3):924-30.

46. Tarkowski E, Andreasen N, Tarkowski A, Blennow K. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(9):1200-5.

47. Moreau T, Coles A, Wing M, Isaacs J, Hale G, Waldmann H, et al. Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. *Brain*. 1996;119 (Pt 1):225-37.

48. Yan X, Tezel G, Wax MB, Edward DP. Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(5):666-73.

49. Yuan L, Neufeld AH. Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*. 2000;32(1):42-50.

50. Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(8):1787-94.

51. Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kwong JM, Ross-Cisneros FN, Wang J, Tsai RK, et al. TNF-alpha-induced optic nerve degeneration and nuclear factor-kappaB p65. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(4):1448-57.
52. Madigan MC, Sadun AA, Rao NS, Dugel PU, Tenhula WN, Gill PS. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced optic neuropathy in rabbits. *Neurol Res.* 1996;18(2):176-84.
53. Tezel G, Wax MB. Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 2000;20(23):8693-700.
54. 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(2):226-32.
55. Dick AD, McMenamin PG, Korner H, Scallon BJ, Ghrayeb J, Forrester JV, et al. Inhibition of tumor necrosis factor activity minimizes target organ damage in experimental autoimmune uveoretinitis despite quantitatively normal activated T cell traffic to the retina. *Eur J Immunol.* 1996;26(5):1018-25.
56. Okada AA, Sakai J, Usui M, Mizuguchi J. Intraocular cytokine quantification of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Ocul Immunol Inflamm.* 1998;6(2):111-20.
57. Santos Lacombe M, Marcos Martin C, Gallardo Galera JM, Gomez Vidal MA, Collantes Estevez E, Ramirez Chamond R, et al. Aqueous humor and serum tumor necrosis factor-alpha in clinical uveitis. *Ophthalmic Res.* 2001;33(5):251-5.
58. Palexas GN, Sussman G, Welsh NH. Ocular and systemic determination of IL-1 beta and tumour necrosis factor in a patient with ocular inflammation. *Scand J Immunol Suppl.* 1992;11:173-5.

-
59. Brito BE, O'Rourke LM, Pan Y, Anglin J, Planck SR, Rosenbaum JT. IL-1 and TNF receptor-deficient mice show decreased inflammation in an immune complex model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(11):2583-9.
60. Richards JC, Tay-Kearney ML, Murray K, Manners P. Infliximab for juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2005;33(5):461-8.
61. Rajaraman RT, Kimura Y, Li S, Haines K, Chu DS. Retrospective case review of pediatric patients with uveitis treated with infliximab. *Ophthalmology*. 2006;113(2):308-14.
62. Kahn P, Weiss M, Imundo LF, Levy DM. Favorable response to high-dose infliximab for refractory childhood uveitis. *Ophthalmology*. 2006;113(5):860-4 e2.
63. Reiff A, Takei S, Sadeghi S, Stout A, Shaham B, Bernstein B, et al. Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. *Arthritis Rheum*. 2001;44(6):1411-5.
64. Smith JA, Thompson DJ, Whitcup SM, Suhler E, Clarke G, Smith S, et al. A randomized, placebo-controlled, double-masked clinical trial of etanercept for the treatment of uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;53(1):18-23.
65. Galor A, Perez VL, Hammel JP, Lowder CY. Differential effectiveness of etanercept and infliximab in the treatment of ocular inflammation. *Ophthalmology*. 2006;113(12):2317-23.
66. Tynjala P, Lindahl P, Honkanen V, Lahdenne P, Kotaniemi K. Infliximab and etanercept in the treatment of chronic uveitis associated with refractory juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(4):548-50.

-
67. Vazquez-Cobian LB, Flynn T, Lehman TJ. Adalimumab therapy for childhood uveitis. *J Pediatr*. 2006;149(4):572-5.
68. Guignard S, Gossec L, Salliot C, Ruysen-Witrant A, Luc M, Duclos M, et al. Efficacy of tumour necrosis factor blockers in reducing uveitis flares in patients with spondylarthropathy: a retrospective study. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(12):1631-4.
69. Mushtaq B, Saeed T, Situnayake RD, Murray PI. Adalimumab for sight-threatening uveitis in Behcet's disease. *Eye*. 2007;21(6):824-5.
70. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1996 ;271(2):736-41.
71. Sfrikakis PP, Markomichelakis N, Theodossiadi GP, Grigoropoulos V, Katsilambros N, Theodossiadi PG. Regression of sight-threatening macular edema in type 2 diabetes following treatment with the anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody infliximab. *Diabetes Care*. 2005;28(2):445-7.
72. Tsilimbaris MK, Panagiotoglou TD, Charisis SK, Anastasakis A, Krikonis TS, Christodoulakis E. The use of intravitreal etanercept in diabetic macular oedema. *Semin Ophthalmol*. 2007;22(2):75-9.
73. Shi X, Semkova I, Muther PS, Dell S, Kociok N, Joussen AM. Inhibition of TNF-alpha reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2006;83(6):1325-34.
74. Lichtlen P, Lam TT, Nork TM, Streit T, Urech DM. Relative contribution of VEGF and TNF-alpha in the cynomolgus laser-induced CNV model: comparing the efficacy of bevacizumab, adalimumab, and ESBA105. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(9):4738-45.

75. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW. Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(8):3586-92.
76. Limb GA, Hollifield RD, Webster L, Charteris DG, Chignell AH. Soluble TNF receptors in vitreoretinal proliferative disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(7):1586-91.
77. Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, Kotajima N, Tamura J, Kobayashi I, et al. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. *J Diabetes Complications*. 2001;15(5):257-9.
78. Gustavsson C, Agardh E, Bengtsson B, Agardh CD. TNF-alpha is an independent serum marker for proliferative retinopathy in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2008;22(5):309-16.
79. Mysliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Mysliwska J, Lipowski P, Raczynska K. The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;79(1):141-6.
80. Zorena K, Mysliwska J, Mysliwiec M, Balcerska A, Hak L, Lipowski P, et al. Serum TNF-alpha level predicts nonproliferative diabetic retinopathy in children. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:92196.
81. Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Kirchhof B, Koizumi K, Dohmen S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *Faseb J*. 2002;16(3):438-40.
82. Strunk J, Bundke E, Lange U. Anti-TNF-alpha antibody Infliximab and glucocorticoids reduce serum vascular endothelial growth factor levels in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatol Int*. 2006;26(3):252-6.

-
83. Giansanti F, Barbera ML, Virgili G, Pieri B, Emmi L, Menchini U. Infliximab for the treatment of posterior uveitis with retinal neovascularization in Behcet disease. *Eur J Ophthalmol*. 2004;14(5):445-8.
84. Japiassu RM, Brasil OF, Cunha AL, de Souza EC. Regression of vasoproliferative tumor with systemic infliximab. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2008;39(4):348-9.
85. Ellerin T, Rubin RH, Weinblatt ME. Infections and anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3013-22.
86. Dixon WG, Watson K, Lunt M, Hyrich KL, Silman AJ, Symmons DP. Rates of serious infection, including site-specific and bacterial intracellular infection, in rheumatoid arthritis patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2368-76.
87. Shakoor N, Michalska M, Harris CA, Block JA. Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy. *Lancet*. 2002;359(9306):579-80.
88. Mohan N, Edwards ET, Cupps TR, Oliverio PJ, Sandberg G, Crayton H, et al. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2862-9.
89. Symmons DP, Silman AJ. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy and the risk of lymphoma in rheumatoid arthritis: no clear answer. *Arthritis Rheum*. 2004;50(6):1703-6.
90. Kwon HJ, Cote TR, Cuffe MS, Kramer JM, Braun MM. Case reports of heart failure after therapy with a tumor necrosis factor antagonist. *Ann Intern Med*. 2003;138(10):807-11.

-
91. Scheinfeld N. Adalimumab: a review of side effects. *Expert Opin Drug Saf.* 2005;4(4):637-41.
92. Gottlieb AB, Evans R, Li S, Dooley LT, Guzzo CA, Baker D, et al. Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(4):534-42.
93. Theodossiadis PG, Markomichelakis NN, Sfrikakis PP. Tumor necrosis factor antagonists: preliminary evidence for an emerging approach in the treatment of ocular inflammation. *Retina.* 2007;27(4):399-413.
94. Keystone EC. Safety of biologic therapies--an update. *J Rheumatol Suppl.* 2005;74:8-12.
95. Suhler EB, Smith JR, Wertheim MS, Lauer AK, Kurz DE, Pickard TD, et al. A prospective trial of infliximab therapy for refractory uveitis: preliminary safety and efficacy outcomes. *Arch Ophthalmol.* 2005;123(7):903-12.
96. Lim L, Suhler EB, Smith JR. Biologic therapies for inflammatory eye disease. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2006;34(4):365-74.
97. Clark AF, Yorio T. Ophthalmic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(6):448-59.
98. Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, Dib E, Fiod Costa E, Furlani BA, et al. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals--part I: animal models and toxicity assays. *Ophthalmic Res.* 2010;44(2):82-104.
99. Romano C, Hicks D. Adult retinal neuronal cell culture. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(4):379-97.

100. Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;60(2):207-25.
101. Jin Y, Uchida S, Yanagi Y, Aihara M, Araie M. Neurotoxic effects of trypan blue on rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.* 2005;81(4):395-400.
102. Narayanan R, Kenney MC, Kamjoo S, Trinh TH, Seigel GM, Resende GP, et al. Trypan blue: effect on retinal pigment epithelial and neurosensory retinal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(1):304-9.
103. Luthra S, Narayanan R, Marques LE, Chwa M, Kim DW, Dong J, et al. Evaluation of in vitro effects of bevacizumab (Avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina.* 2006;26(5):512-8.
104. Limb GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE, Khaw PT. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(3):864-9.
105. Bargagna-Mohan P, Ravindranath PP, Mohan R. Small molecule anti-angiogenic probes of the ubiquitin proteasome pathway: potential application to choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(9):4138-45.
106. Kummar S, Gutierrez M, Doroshow JH, Murgo AJ. Drug development in oncology: classical cytotoxics and molecularly targeted agents. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;62(1):15-26.
107. Stalmans P, Van Aken EH, Veckeneer M, Feron EJ, Stalmans I. Toxic effect of indocyanine green on retinal pigment epithelium related to osmotic effects of the solvent. *Am J Ophthalmol.* 2002;134(2):282-5.
108. Kozak I, Cheng L, Silva GA, Freeman WR. Testing of intraocular drugs for clinical use. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(11):4861-3.

109. Rosolen SG, Rigaudiere F, Le Gargasson JF, Brigell MG. Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Doc Ophthalmol*. 2005;110(1):57-66.
110. Brigell M, Dong CJ, Rosolen S, Tzekov R. An overview of drug development with special emphasis on the role of visual electrophysiological testing. *Doc Ophthalmol*. 2005;110(1):3-13.
111. Rosolen SG, Kolomiets B, Varela O, Picaud S. Retinal electrophysiology for toxicology studies: applications and limits of ERG in animals and ex vivo recordings. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(1):17-32.
112. Perlman I. Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques. *Doc Ophthalmol*. 2009;118(1):3-28.
113. Bill A. Proceedings: Physiology and pharmacology of ocular circulation. *Exp Eye Res*. 1973;17(4):387.
114. Bill A, Stjernschantz J. Cholinergic vasoconstrictor effects in the rabbit eye: vasomotor effects of pentobarbital anesthesia. *Acta Physiol Scand*. 1980;108(4):419-24.
115. Tano Y, Sugita G, Abrams G, Machemer R. Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. *Am J Ophthalmol*. 1980;89(1):131-6.
116. Zemel E, Loewenstein A, Lei B, Lazar M, Perlman I. Ocular pigmentation protects the rabbit retina from gentamicin-induced toxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(9):1875-84.
117. Perlman I. Relationship between the amplitudes of the b wave and the a wave as a useful index for evaluating the electroretinogram. *Br J Ophthalmol*. 1983;67(7):443-8.

-
118. Gouras P. Electroretinography: Some basic principles. *Invest Ophthalmol.* 1970;9(8):557-69.
119. Marmor MF. An updated standard for clinical electroretinography. *Arch Ophthalmol.* 1995;113(11):1375-6.
120. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol.* 2009;118(1):69-77.
121. Marmor MF, Holder GE, Porciatti V, Trick GL, Zrenner E. Guidelines for basic pattern electroretinography. Recommendations by the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol.* 1995;91(4):291-8.
122. Marmor MF, Holder GE, Seeliger MW, Yamamoto S. Standard for clinical electroretinography (2004 update). *Doc Ophthalmol.* 2004;108(2):107-14.
123. Brown KT, Wiesel TN. Localization of origins of electroretinogram components by intraretinal recording in the intact cat eye. *J Physiol.* 1961;158:257-80.
124. Newman EA, Odette LL. Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. *J Neurophysiol.* 1984;51(1):164-82.
125. Ogden TE. The oscillatory waves of the primate electroretinogram. *Vision Res.* 1973;13(6):1059-74.
126. Wachtmeister L, Dowling JE. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978;17(12):1176-88.
127. Machida S, Gotoh Y, Tanaka M, Tazawa Y. Predominant loss of the photopic negative response in central retinal artery occlusion. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(5):938-40.

128. Drasdo N, Aldebasi YH, Chiti Z, Mortlock KE, Morgan JE, North RV. The s-cone PHNR and pattern ERG in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(6):1266-72.
129. Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Walters JW. The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(2):514-22.
130. Colotto A, Falsini B, Salgarello T, Iarossi G, Galan ME, Scullica L. Photopic negative response of the human ERG: losses associated with glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(8):2205-11.
131. Weymouth AE, Vingrys AJ. Rodent electroretinography: methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(1):1-44.
132. Gjørloff K, Andreasson S, Ehinger B. Standardized full-field electroretinography in rabbits. *Doc Ophthalmol*. 2004;109(2):163-8.
133. Abd-El-Barr MM, Albini TA, Carvounis PE, He F, Manzano RP, Chavez-Barrios P, et al. Safety and pharmacokinetics of triamcinolone hexacetonide in rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2008;24(2):197-205.
134. Hata Y, Enaida H, Sassa Y, Ueno A, Miura M, Hisatomi T, et al. Preclinical investigation of fluorometholone acetate as a potential new adjuvant during vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245(7):1019-25.
135. Marmor MF. The ERG is alive and well. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(11):1371-2.
136. Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography (1994 update). *Doc Ophthalmol*. 1995;89(3):199-210.

-
137. Chaudhary V, Hansen R, Lindgren H, Fulton A. Effects of telazol and nembutal on retinal responses. *Doc Ophthalmol*. 2003;107(1):45-51.
138. Tremblay F, Parkinson JE. Alteration of electroretinographic recordings when performed under sedation or halogenate anesthesia in a pediatric population. *Doc Ophthalmol*. 2003;107(3):271-9.
139. Mizota A, Adachi-Usami E. Effect of body temperature on electroretinogram of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(12):3754-7.
140. Lachapelle P, Benoit J, Guite P. The effect of in vivo retinal cooling on the electroretinogram of the rabbit. *Vision Res*. 1996;36(3):339-44.
141. Hrach CJ, Johnson MW, Hassan AS, Lei B, Sieving PA, Elner VM. Retinal toxicity of commercial intravitreal tissue plasminogen activator solution in cat eyes. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(5):659-63.
142. Raghava S, Hammond M, Kompella UB. Periocular routes for retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2004;1(1):99-114.
143. Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006;3(2):275-87.
144. Pavan PR, Brinser JH. Exogenous bacterial endophthalmitis treated without systemic antibiotics. *Am J Ophthalmol*. 1987;104(2):121-6.
145. Pavan PR, Brinser JH. Treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* endophthalmitis with intravitreal vancomycin. *Ophthalmology*. 1987;94(7):896.
146. Johnson TM. Endophthalmitis vitrectomy study. *Can J Ophthalmol*. 2003 Jun;38(4):264; author reply -5.

147. Peyman GA, Schulman JA. Intravitreal drug therapy. *Jpn J Ophthalmol*. 1989;33(4):392-404.
148. Ohm J. Über die Behandlung der Netzhautablösung durch operative Entleerung der subretinalen Flüssigkeit und Einspritzung von Luft in den Glaskörper. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1911;79:442-50.
149. Rycroft BW. Penicillin and the Control of Deep Intra-Ocular Infection. *Br J Ophthalmol*. 1945;29(2):57-87.
150. Schneider J, Frankel SS. Treatment of late postoperative intraocular infections with intraocular injection of penicillin. *Arch Ophthalmol*. 1947;37(3):304-7.
151. Von Sallmann L. Experimental study on penicillin treatment of ectogenous infection of vitreous. *Arch Ophthalmol*. 1944;32:179-89.
152. Dunnington JH, Von Sallmann L. Observations on Penicillin Therapy in Ophthalmology. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1944;42:132-54.
153. Rosengren B. 300 cases operated upon for retinal detachment; method and results. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1952;30(1):117-22.
154. Cibis PA, Becker B, Okun E, Canaan S. The use of liquid silicone in retinal detachment surgery. *Arch Ophthalmol*. 1962;68:590-9.
155. Peyman GA, Herbst R. Bacterial endophthalmitis. Treatment with intraocular injection of gentamicin and dexamethasone. *Arch Ophthalmol*. 1974;91(5):416-8.
156. Peyman GA, Sanders DR. Management of endophthalmitis. *Trans Ophthalmol Soc N Z*. 1977;29:95-100.
157. Bennett TO, Peyman GA. Toxicity of intravitreal aminoglycosides in primates. *Can J Ophthalmol*. 1974;9(4):475-8.

158. Daily MJ, Peyman GA, Fishman G. Intravitreal injection of methicillin for treatment of endophthalmitis. *Am J Ophthalmol.* 1973;76(3):343-50.
159. Baum J, Peyman GA, Barza M. Intravitreal administration of antibiotic in the treatment of bacterial endophthalmitis. III. Consensus. *Surv Ophthalmol.* 1982;26(4):204-6.
160. Henry K, Cantrill H, Fletcher C, Chinnock BJ, Balfour HH, Jr. Use of intravitreal ganciclovir (dihydroxy propoxymethyl guanine) for cytomegalovirus retinitis in a patient with AIDS. *Am J Ophthalmol.* 1987;103(1):17-23.
161. de Smet MD, Meenken CJ, van den Horn GJ. Fomivirsen - a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 1999;7(3-4):189-98.
162. McCuen BW, 2nd, Bessler M, Tano Y, Chandler D, Machemer R. The lack of toxicity of intravitreally administered triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol.* 1981;91(6):785-8.
163. Tano Y, Chandler DB, McCuen BW, Machemer R. Glucocorticosteroid inhibition of intraocular proliferation after injury. *Am J Ophthalmol.* 1981;91(2):184-9.
164. Blankenship GW. Evaluation of a single intravitreal injection of dexamethasone phosphate in vitrectomy surgery for diabetic retinopathy complications. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1991;229(1):62-5.
165. Penfold PL, Gyory JF, Hunyor AB, Billson FA. Exudative macular degeneration and intravitreal triamcinolone. A pilot study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1995;23(4):293-8.

166. Fishburne BC, Wilson DJ, Rosenbaum JT, Neuwelt EA. Intravitreal methotrexate as an adjunctive treatment of intraocular lymphoma. *Arch Ophthalmol*. 1997;115(9):1152-6.
167. Hassan AS, Johnson MW, Schneiderman TE, Regillo CD, Tornambe PE, Poliner LS, et al. Management of submacular hemorrhage with intravitreal tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement. *Ophthalmology*. 1999;106(10):1900-6.
168. Batioglu F, Ozmert E, Akmese E. Two-year results of intravitreal triamcinolone acetonide injection for the treatment of macular edema due to central retinal vein occlusion. *Ann Ophthalmol (Skokie)*. 2007;39(4):307-12.
169. Batioglu F, Ozmert E, Parmak N, Celik S. Two-year results of intravitreal triamcinolone acetonide injection for the treatment of diabetic macular edema. *Int Ophthalmol*. 2007;27(5):299-306.
170. Brown DM, Campochiaro PA, Singh RP, Li Z, Gray S, Saroj N, et al. Ranibizumab for macular edema following central retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1124-33.
171. Campochiaro PA, Heier JS, Feiner L, Gray S, Saroj N, Rundle AC, et al. Ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1102-12 e1.
172. Ip MS, Scott IU, VanVeldhuisen PC, Oden NL, Blodi BA, Fisher M, et al. A randomized trial comparing the efficacy and safety of intravitreal triamcinolone with observation to treat vision loss associated with macular edema secondary to central retinal vein occlusion: the Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE) study report 5. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(9):1101-14.

173. Scott IU, Ip MS, VanVeldhuisen PC, Oden NL, Blodi BA, Fisher M, et al. A randomized trial comparing the efficacy and safety of intravitreal triamcinolone with standard care to treat vision loss associated with macular Edema secondary to branch retinal vein occlusion: the Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE) study report 6. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(9):1115-28.
174. Stahl A, Struebin I, Hansen LL, Agostini HT, Feltgen N. Bevacizumab in central retinal vein occlusion: a retrospective analysis after 2 years of treatment. *Eur J Ophthalmol*. 2010;20(1):180-5.
175. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009;116(1):57-65 e5.
176. Mitchell P, Korobelnik JF, Lanzetta P, Holz FG, Prunte C, Schmidt-Erfurth U, et al. Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(1):2-13.
177. Carneiro AM, Falcao MS, Brandao EM, Falcao-Reis FM. Intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration with or without prior treatment with photodynamic therapy: one-year results. *Retina*. 2010;30(1):85-92.
178. Ozkiris A. Anti-VEGF agents for age-related macular degeneration. *Expert Opin Ther Pat*. 2010;20(1):103-18.
179. Rodrigues EB, Meyer CH, Mennel S, Farah ME. Mechanisms of intravitreal toxicity of indocyanine green dye: implications for chromovitrectomy. *Retina*. 2007;27(7):958-70.
180. Ness T, Feltgen N, Agostini H, Bohringer D, Lubrich B. Toxic vitreitis outbreak after intravitreal injection. *Retina*. 2010;30(2):332-8.

-
181. Giganti M, Beer PM, Lemanski N, Hartman C, Schartman J, Falk N. Adverse events after intravitreal infliximab (Remicade). *Retina*. 2010;30(1):71-80.
182. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET, Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina*. 2004;24(5):676-98.
183. Aiello LP, Brucker AJ, Chang S, Cunningham ET, Jr., D'Amico DJ, Flynn HW, Jr., et al. Evolving guidelines for intravitreal injections. *Retina*. 2004;24(5 Suppl):S3-19.
184. Mezaad-Koursh D, Goldstein M, Heilwail G, Zayit-Soudry S, Loewenstein A, Barak A. Clinical characteristics of endophthalmitis after an injection of intravitreal antivascular endothelial growth factor. *Retina*. 2010;30(7):1051-7.
185. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006;355(14):1419-31.
186. Pilli S, Kotsolis A, Spaide RF, Slakter J, Freund KB, Sorenson J, et al. Endophthalmitis associated with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy injections in an office setting. *Am J Ophthalmol*. 2008;145(5):879-82.
187. Heier JS, Antoszyk AN, Pavan PR, Leff SR, Rosenfeld PJ, Ciulla TA, et al. Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a phase I/II multicenter, controlled, multidose study. *Ophthalmology*. 2006;113(4):633 e1-4.
188. Wu L, Martinez-Castellanos MA, Quiroz-Mercado H, Arevalo JF, Berrocal MH, Farah ME, et al. Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(1):81-7.

189. Duarte MI, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CE. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol.* 1992;16(4):475-82.
190. Yoshizumi MO, Banihashemi AR. Experimental intravitreal ketoconazole in DMSO. *Retina.* 1988;8(3):210-5.
191. Tolentino FI, Foster CS, Lahav M, Liu LH, Rabin AR. Toxicity of intravitreal miconazole. *Arch Ophthalmol.* 1982;100(9):1504-9.
192. Unal M, Peyman GA, Liang C, Hegazy H, Molinari LC, Chen J, et al. Ocular toxicity of intravitreal clarithromycin. *Retina.* 1999;19(5):442-6.
193. Serracarbassa PD, Peyman GA, Liang C, Calixto N, Jr., Nair MG. Toxicity and efficacy of intravitreal injection of spartanamicin B in the treatment of Candida endophthalmitis. *Int Ophthalmol.* 1998;22(1):53-8.
194. Giansanti F, Ramazzotti M, Vannozzi L, Rapizzi E, Fiore T, Iaccheri B, et al. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 ;49(3):1151-6.
195. Theodossiadis PG, Liarakos VS, Sfikakis PP, Vergados IA, Theodossiadis GP. Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(5):825-30, 30 e1.
196. Mo JS, Streilein JW. Immune privilege persists in eyes with extreme inflammation induced by intravitreal LPS. *Eur J Immunol.* 2001;31(12):3806-15.
197. Dick HB, Augustin AJ, Pakula T, Pfeiffer N. Endotoxins in ophthalmic viscosurgical devices. *Eur J Ophthalmol.* 2003;13(2):176-84.

198. Peters NT, Iskander NG, Anderson Penno EE, Woods DE, Moore RA, Gimbel HV. Diffuse lamellar keratitis: isolation of endotoxin and demonstration of the inflammatory potential in a rabbit laser in situ keratomileusis model. *J Cataract Refract Surg*. 2001;27(6):917-23.
199. Park HS, Kim MS. The inflammatory potential of surgical glove lubricants: Biosorb, Keoflo, calcium carbonate and Hydrocote after intravitreal injection. *Korean J Ophthalmol*. 1997;11(1):51-9.
200. Stepien KE, Eaton AM, Jaffe GJ, Davis JL, Raja J, Feuer W. Increased incidence of sterile endophthalmitis after intravitreal triamcinolone acetonide in spring 2006. *Retina*. 2009;29(2):207-13.
201. Androudi S, Tsironi E, Kalogeropoulos C, Theodoridou A, Brazitikos P. Intravitreal adalimumab for refractory uveitis-related macular edema. *Ophthalmology*. 2010;117(8):1612-6.
202. Ho JD, Tsai RJ, Chen SN, Chen HC. Toxic effect of indocyanine green on retinal pigment epithelium related to osmotic effects of the solvent. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(2):258.
203. Marmor MF. Retinal detachment from hyperosmotic intravitreal injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979;18(12):1237-44.