

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

**GABRIELA LOURENÇON IOSHIMOTO**

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

São Paulo

2015

**GABRIELA LOURENÇON IOSHIMOTO**

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

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

São Paulo

2015

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

Catálogo na publicação

Biblioteca Dante Moreira Leite

Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Ioshimoto, Gabriela Lourençon.

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

95 f.

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

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

BF241

## **DEDICATÓRIA**

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

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

## PREFÁCIO

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

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

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

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

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



## SUMÁRIO

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

### **Capítulo 1**

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

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

### **Capítulo 2**

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

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

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

### **Capítulo 3**

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

