

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

ALAN RICARDO RASSI

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RETINIANAS EM OLHOS DE
COELHOS APÓS INJEÇÕES INTRAVÍTREAS SERIADAS DE
INFLIXIMABE

Tese apresentada à Universidade Federal de
Goiás - Faculdade de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências da Saúde

GOIÂNIA - GO
2011

ALAN RICARDO RASSI

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RETINIANAS EM OLHOS DE COELHOS APÓS
INJEÇÕES INTRAVÍTREAS SERIADAS DE INFLIXIMABE**

Trabalho realizado no Centro de Referência em Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, com a colaboração do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Pereira de Ávila

Professor Titular de Oftalmologia – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás

Co-orientadores:

Prof. Dr. Moacyr Pezati Rigueiro

Professor Adjunto do Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. David Leonardo Cruvinel Isaac

Professor Adjunto de Oftalmologia – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás

Dedicatória

Aos meus pais, Elias e Tatiana, responsáveis pelo meu aprendizado e que tornaram possível a realização de todos os meus sonhos.

A minha mulher, Lídia, pelo amor e compreensão, especialmente naqueles momentos críticos, pela perseverança.

Aos meus filhos, Elias, Pedro e Vladimir, uma das razões de minha vida e a principal razão deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Marcos Pereira Ávila, Professor Titular e Chefe da Disciplina de Oftalmologia do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela valiosa orientação e grande incentivo na concretização deste trabalho e pela amizade fraternal que nos une e que consolidamos ao longo dos anos.

Ao Professor Doutor Moacyr Pezati Rigueiro, Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, meus sinceros agradecimentos pela orientação, preparação e análise dos estudos anatomopatológicos.

Ao Professor Doutor David Leonardo Isaac, Professor Adjunto do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFG, pelo imenso apoio e auxílio na elaboração desta tese.

Às Doutoradas Letícia Alves, Ericka Freitas e Luciana Carneiro, médicas do Centro de Referência em Oftalmologia (CEROF) da UFG, pela realização e análise dos resultados dos exames eletrofisiológicos.

À Doutora Ekaterina Akimovna Botozchenko Rivera, Chefe do Biotério da UFG, pela atenção e dedicação durante o período em que os animais permaneceram sob seus cuidados.

Ao Professor Doutor Celmo Celso Porto, Professor Titular do Departamento de Clínica Médica e Coordenador do Serviço de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFG, pelo incentivo constante.

Ao oftalmologista Murilo Batista Abud, ex-residente do CEROF-UFG, pós-graduando em Ciências da Saúde da UFG, pela colaboração durante a realização deste estudo.

Aos acadêmicos de medicina da Universidade Federal de Goiás, Jorge Agi e Walter Ludwig A. Sheross, pelo auxílio durante a realização dos exames e das cirurgias.

Às funcionárias Maria Goretti Batista, Tainara Sardeiro e Célia Regina Malveste, pela colaboração durante a realização dos exames de eletrofisiologia e nas cirurgias.

À Danúbia Franco, farmacêutica do CEROF-UFG, pelos estudos farmacológicos que propiciaram a obtenção e a realização do fracionamento na dosagem correta do infliximabe, para injeção intravítrea.

A todos os funcionários, médicos e residentes que formam esta brilhante e competente equipe e que a cada dia colocam o nome do CEROF-UFG entre os melhores serviços públicos de diagnóstico e tratamento das doenças oculares.

Aos meus irmãos Ivan, Darlan, Nelson e Denise, pelo apoio e pela amizade que nos une.

Sumário

	Dedicatória.....	iv
	Agradecimentos.....	v
	Lista de figuras.....	viii
	Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
	Resumo.....	x
	Abstract.....	xi
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Fator de necrose tumoral.....	3
2.2	Anticorpos monoclonais.....	6
2.3	Infliximabe.....	9
2.4	Infliximabe na retinopatia diabética.....	11
2.5	Infliximabe nas uveítes.....	13
2.6	Infliximabe na degeneração macular relacionada à idade.....	16
2.7	Efeitos colaterais do uso de infliximabe por via endovenosa.....	18
2.8	Eletrorretinografia.....	19
2.9	Retina do coelho.....	21
3	OBJETIVOS	24
4	MÉTODOS	25
4.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	26
4.2	Anestesia.....	26
4.3	Exames eletrofisiológicos.....	28
4.4	Eutanásia.....	31

4.5	Exame anatomopatológico.....	31
4.6	Exame microscópico.....	32
4.7	Método estatístico.....	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Resultados dos exames eletrorretinográficos.....	33
5.1.1	Análise estatística das avaliações eletrorretinográficas.....	36
5.2	Resultados dos exames anatomopatológicos.....	36
5.2.1	Análise estatística das avaliações histológicas.....	38
5.3	Resultados dos exames clínicos oftalmológicos.....	38
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS	46
9	ANEXOS	56

Lista de figuras

Figura 1	Função do fator de necrose tumoral no processo inflamatório.....	5
Figura 2	Formação de anticorpos monoclonais.....	8
Figura 3	Forma esquemática do infliximabe.....	9
Figura 4	Neutralização do fator de necrose tumoral.....	11
Figura 5	Método utilizado para determinação da amplitude de onda a e b.....	21
Figura 6	Histologia da retina do coelho.....	23
Figura 7	Alojamento dos coelhos.....	26
Figura 8	Aplicação de infliximabe intravítreo.....	27
Figura 9	Coelho sendo submetido a exame de fundo de olho.....	28
Figura 10	Coelho sendo submetido a exame eletrorretinográfico.....	29
Figura 11	Exame eletrorretinográfico antes das injeções de infliximabe.....	30
Figura 12	Exame eletrorretinográfico após injeções de infliximabe e BSS.....	34 e 35
Figura 13	Olho de coelho albino após três aplicações de infliximabe mostrando citoarquitetura retiniana normal.....	37
Figura 14	Presença de um linfócito no vítreo e retina de aspecto normal.....	37
Figura 15	Presença de reação inflamatória na interface vítreoretiniana.....	38

Lista de abreviaturas e siglas

ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
BSS	Solução salina balanceada (do inglês Balanced Salt Solution)
CEROF	Centro de Referência em Oftalmologia
cm	Centímetro
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
ERG	Eletrorretinograma
HACA	Anticorpos antiquméricos humanos (do inglês Human Anti-Chimeric Antibody)
Hz	Hertz
ISCEV	International Society for Clinical Electrophysiology of Vision
kg	Quilograma
mAb	Anticorpos monoclonais (do inglês monoclonal antibodies)
m ²	Metro quadrado
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NK	Células exterminadoras naturais (do inglês Natural Killers)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês Tumor Necrosis Factor)
UFG	Universidade Federal de Goiás
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês Vascular Endothelial Growth Factor)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar os níveis de toxicidade de duas e três aplicações intravítreas de infliximabe na retina e coroide de coelhos albinos, por meio de exames clínicos oftalmológicos, eletrorretinográficos e histológicos. Foram utilizados doze coelhos albinos (24 olhos) da raça New Zealand. Cada olho recebeu duas (n=10 olhos) ou três (n=10 olhos) injeções intravítreas seriadas de 2 mg de infliximabe dissolvidos em 0,06 ml de solução salina, em intervalos mensais. Um grupo separado de olhos (n=4 olhos) serviu como controle. Noventa dias após a primeira injeção, os coelhos foram novamente submetidos a exames clínicos oftalmológicos e eletrorretinográfico e, após enucleados, os olhos foram submetidos a exame histológico. Nos 24 olhos estudados, não foram detectadas alterações clínicas oftalmológicas. A alteração histológica notada foi a presença de raros linfócitos e eosinófilos na região posterior do vítreo de quatro olhos submetidos a duas aplicações e de seis olhos que receberam três aplicações de infliximabe, mas sem significado clínico. Foi encontrada uma única alteração clinicamente significativa, caracterizada como reação inflamatória grave, com presença de exsudatos vítreos nos dois olhos de um coelho, que foi submetido a duas e três aplicações de infliximabe. Os exames eletrorretinográficos mostraram amplitudes em média 12% menores do que aquelas obtidas antes do tratamento, porém sem diferenças estatisticamente significantes, comparando-se a amplitude ou o tempo implícito entre os achados eletrorretinográficos pré e pós-tratamento em todos os grupos examinados. Assim, duas e três aplicações intravítreas de infliximabe em olhos de coelhos em intervalos mensais, na dosagem de 2 mg, não provocaram alterações após seguimento de noventa dias, quer no exame histológico, na eletrorretinografia ou na avaliação clínica oftalmológica. Conclui-se que doses seriadas de infliximabe por via intravítrea em coelhos é um procedimento seguro.

Descritores: fator de necrose tumoral, infliximabe, coelhos, injeção intravítrea, edema macular diabético, degeneração macular relacionada à idade, uveíte.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the levels of toxicity of two and three intravitreal injections of infliximab to the retina and choroid of albino rabbits by means of histological, electroretinographic and clinical ophthalmological tests. Twelve New Zealand albino rabbits (24 eyes) were used in the study. Each eye was given two (n=10) or three (n=10) serial intravitreal 2 mg injections of infliximab dissolved in 0.06 ml of saline, at monthly intervals. A separate group of rabbits (n=4 eyes) served as a control group. Ninety days after the first injection, the rabbits underwent electroretinographic and clinical ophthalmological tests. After being enucleated, the eyes underwent histological examination. No clinical ophthalmologic abnormalities were detected in the 24 eyes studied. The histological change noted was the presence of rare lymphocytes and eosinophiles in the posterior vitreous of four eyes subjected to two injections and six eyes subjected to three injections of infliximab, but it was not considered clinically significant. One clinically significant abnormality was found, a severe inflammatory reaction with vitreous exudates and ganglion cell edema in both eyes of a single rabbit, subjected to two to three injections of infliximab. The electroretinographic tests showed amplitudes that were on the average 12% smaller than those obtained before the treatment. However, there were no statistically significant differences when comparing amplitude or the implicit time between the pre and post-treatment electroretinographic findings, in all groups examined. Then, two and three intravitreal 2 mg injections of infliximab in eyes of rabbits at monthly intervals did not cause any changes after a 90-day follow-up, according to histological, electroretinographic tests and clinical ophthalmological evaluation. It was concluded that serial intravitreal infliximab doses to rabbits is a safe procedure.

Key words: tumor necrosis factor, infliximab, rabbits, intravitreal injections, diabetic macular edema, age-related macular degeneration, uveitis.

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias antiangiogênicas, como pegaptanibe (BENNETT *et al.*, 2007), bevacizumabe (SILVA *et al.*, 2008) e ranibizumabe (KONSTANTINIIS *et al.*, 2009), por via intravítrea, tem sido feito rotineiramente há alguns anos tanto em humanos como em animais. Os bons resultados terapêuticos obtidos e os poucos efeitos colaterais observados têm levado a um maior interesse em pesquisas de novos medicamentos que possam atuar tanto no processo inflamatório quanto na angiogênese.

O fator de necrose tumoral (TNF) tem papel primordial na cascata inflamatória. A liberação de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) eleva-se durante e após o período de atividade do TNF. É possível que medicamentos controladores da produção de TNF possam diminuir a produção de VEGF e atuar diminuindo o estímulo para o surgimento e crescimento da neovascularização da coroide (NVC) e do edema macular nas doenças vasculares da retina, de um modo similar, mais eficaz do que medicamentos que agem somente sobre a atividade do VEGF (ARMSTRONG *et al.*, 1998).

O bloqueio dos efeitos do TNF na produção de mediadores inflamatórios pode diminuir simultaneamente a produção de VEGF (JOUSSEN *et al.*, 2002) e a proliferação das células do epitélio pigmentoso. Estas podem se transformar em células semelhantes aos macrófagos, aumentando a inflamação (CANET *et al.*, 2004), prevenindo assim a perda irreversível dos tecidos retinianos e a fibrose local (BEER *et al.*, 2006).

Anticorpos monoclonais anti-TNF são utilizados há alguns anos no tratamento, por via endovenosa, de doenças inflamatórias autoimunes, sobretudo em reumatologia, com grande sucesso. No entanto, os efeitos colaterais da utilização desses medicamentos por via endovenosa são bastante frequentes (HYRICH *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos com a utilização desses medicamentos por via intravítrea foram feitos inicialmente em coelhos (THEODOSSIADIS *et al.*, 2005; GIANSANTI *et al.*, 2008), usando uma única aplicação. A utilização de infliximabe por via intravítrea em pacientes portadores de degeneração macular (THEODOSSIADIS *et al.*, 2009) mostrou resultados animadores.

Como na maioria dos medicamentos até aqui utilizados por via intravítrea são quase

sempre necessárias várias doses para alcançar efeitos terapêuticos almejados, não se conhece os efeitos tóxicos e as possíveis complicações de injeções seriadas intravítreas de infliximabe. Este estudo foi desenvolvido com o propósito de verificar as possíveis alterações nas camadas da retina sensorial incluindo o epitélio pigmentar e coroide.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fator de necrose tumoral

Fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina multifuncional sintetizada pelos monócitos, macrófagos, linfócitos T (CD4, CD8) e, em menor quantidade, pelos mastócitos, neutrófilos, células exterminadoras naturais (NK), células endoteliais, células musculares lisas, osteoclastos e fibroblastos, em resposta a infecções e injúrias imunológicas e tem um papel importante na apoptose e sobrevivência celular, na inflamação e na imunidade (BAZZONI *et al.*, 1996).

Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células, durante a resposta imunológica. Elas têm a função de regular a duração e intensidade das respostas específicas, recrutar células efetoras para as áreas nas quais se desenvolvem respostas e induzir a geração e maturação de novas células com base em precursores (LOCKSLEY *et al.*, 2001).

As citocinas são produzidas durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade para mediar e regular a resposta inflamatória. Têm uma vida média curta. Elas somente estimulam as células com receptores específicos na membrana da célula alvo e têm ação potente. São moléculas pleiotrópicas (podem atuar sobre muitos tipos celulares diferentes). Também são redundantes (várias citocinas podem efetuar as mesmas ações) (LOCKSLEY *et al.*, 2001).

As citocinas podem induzir efeitos diferentes sobre as mesmas células alvo de forma separada no tempo ou simultaneamente. Podem também influenciar a ação de outras citocinas de forma antagônica ou sinérgica (JANEWAY *et al.*, 1999).

O TNF liga-se aos receptores na superfície de células inflamatórias, incluindo linfócitos, neutrófilos e células endoteliais e exacerba a inflamação. A liberação de TNF durante o processo inflamatório é importante por causar maior aporte de neutrófilos para o sítio da inflamação, vaso-dilatação, adesão dos neutrófilos ao endotélio, aumentando a morte de bactérias pelos neutrófilos. Altos níveis de TNF, porém, podem causar choque séptico, liberação de outras citocinas, caquexia e insuficiência cardíaca (FELDMANN *et al.*, 2001).

O TNF promove a inflamação por citotoxicidade direta, bem como por vários mecanismos indiretos, como o aumento da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, de moléculas de adesão e de fatores angiogênicos (BAZZONI *et al.*, 1996). Insuficiência de regular a produção do TNF no sítio da lesão inflamatória leva à ativação desse processo e à lesão tecidual crônica (FELDMANN *et al.*, 2001).

Um grande suporte para esses estudos biológicos tem sido propiciado pela geração de camundongos transgênicos com superprodução de TNF humano em suas articulações. Esses camundongos desenvolvem poliartrite inflamatória crônica com 100% de penetrância fenotípica (KEFFER *et al.*, 1991) e respondem ao tratamento usado na artrite reumatoide humana (DOUNI *et al.*, 2004).

A neutralização da atividade do TNF provoca desativação em cascata das citocinas pró-inflamatórias, diminuição da migração de células para o sítio da inflamação, diminuição da angiogênese, mediada pelo VEGF e diminuição das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e da permeabilidade vascular (SFIKAKIS *et al.*, 2003).

As principais proteínas da fase aguda do processo inflamatório medidas atualmente por técnicas sensíveis são a proteína C reativa, a alfa 1 glicoproteína ácida e o amiloide sérico tipo A. Antes de serem liberadas no plasma, essas proteínas são estimuladas por uma série de citocinas pró-inflamatórias, moléculas que agem por mecanismos de mensagem intracelular e que necessitam de um receptor específico para se ligarem e desenvolverem uma resposta (FELDMANN *et al.*, 2001).

Na maioria das vezes, o efeito é primariamente local, mas se elas forem produzidas em grande quantidade, ou se o estímulo for persistente, há resposta sistêmica.

O TNF tem papel central no desencadeamento de eventos na chamada cascata inflamatória (figura 1). Ele induz a produção de outras citocinas inflamatórias, sobretudo a interleucina (IL-1), que tem ação quase idêntica a do TNF (LOCKSLEY *et al.*, 2001).

A reação começa com a produção de TNF e vai se autoperpetuando, induzindo a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, até uma redução na resposta pela ação das citocinas contra-reguladoras.

Função TNF no processo inflamatório

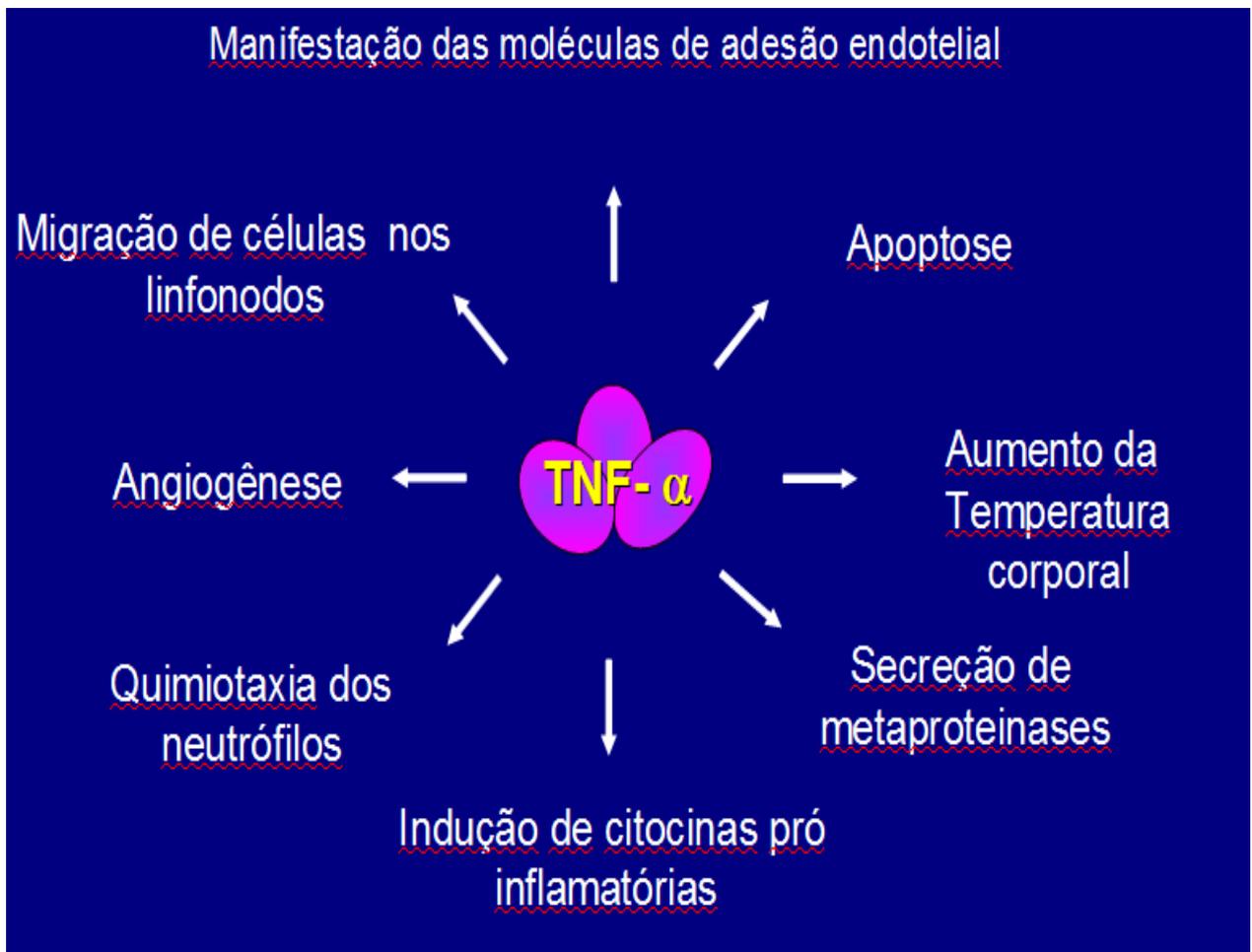


Figura 1– Função do fator de necrose tumoral no processo inflamatório

Fonte: Jacobi A, *et al.*, JEA V 2006:2006; 20:1171-1187

O TNF tem ação pleiotrópica, ou seja, é capaz de agir em praticamente todos os tecidos e órgãos. Como efeito do TNF, há, em especial, ativação de neutrófilos e células endoteliais, efeitos vasculares conhecidos como choque, febre e ativação de resposta do estresse conhecido como respostas da fase aguda. Os efeitos crônicos, como a anemia, emagrecimento, reabsorção óssea e processos inflamatórios crônicos já são bastante conhecidos há algum tempo (BAZZONI *at al.*, 2001).

A resposta imune inata ou natural, fundamental para a existência da espécie humana, e crucial na defesa do hospedeiro, é mediada por neutrófilos, monócitos e pelas chamadas células exterminadoras naturais (NK) (Natural Killers). Estas células são um tipo de linfócitos

do sistema imunológico especializados no combate aos vírus, às bactérias e às células tumorais, sem conhecimento prévio de um antígeno específico. Nessa resposta, reconhecem-se patógenos com uma pequena gama de receptores, e ela inclui, de forma fundamental, a elaboração de citocinas, sobretudo o TNF (JANEWAY *et al.*, 1999). Em virtude dessa resposta inata, que é a barreira inicial da atividade imunológica, o ser humano é capaz de livrar-se de uma série de antígenos invasores e controlar várias infecções que poderiam tornar-se crônicas.

O TNF é uma proteína capaz de provocar resposta biológica importante e fundamental para a manutenção da saúde contra várias doenças, especialmente as inflamatórias agudas e crônicas, processos infecciosos, neoplasias malignas, e processos catabólicos. A formação de granulomas é totalmente dependente do TNF (EDWARDS *et al.*, 2000).

O TNF ativa a formação de substâncias envolvidas nas respostas inflamatórias e imunorregulatórias, compreendendo quimiocinas, citocinas e prostaglandinas. Ele afeta a proliferação, a resposta inflamatória e a morte celular programada ou apoptose. Este fator de necrose tumoral está envolvido em um amplo espectro de doenças inflamatórias, e sua inibição farmacológica é de grande valor terapêutico na artrite reumatoide (MAIN *et al.*, 2000), doença de Crohn (LEWIS *et al.*, 2007), doença de Behçet (SFIKAKIS *et al.*, 2001), e espondilite anquilosante (CLEGG *et al.*, 2006).

2.2 Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais (mAb) (monoclonal antibodies) são sintetizados por plasmócitos originados de um único linfócito B, que é clonado e imortalizado, produzindo sempre os mesmos anticorpos em resposta a um agente patogênico. Esses anticorpos apresentam-se iguais em estrutura, especificidade e afinidade, ligando-se por isso ao mesmo epítopo (menor porção do antígeno capaz de gerar a resposta imune).

A presença de diferentes epítopos na superfície do antígeno pode desencadear uma produção de anticorpos com diferentes especificidades e a ativação policlonal de linfócitos T.

A existência de anticorpos diferentes para um mesmo agente patogênico torna a resposta pouco eficiente e, por isso, os anticorpos monoclonais têm maior eficiência. Em decorrência, na pesquisa de diagnósticos e terapias eficazes contra certas doenças, utilizam-se preferencialmente os anticorpos monoclonais.

A descoberta dos mielomas, neoplasias oriundas de células tumorais de plasmócitos, contribuiu fortemente para o avanço das pesquisas de determinação da estrutura e da funcionalidade dos anticorpos (WU e KABAT, 1970). Os anticorpos recuperados de mielomas eram mais facilmente obtidos do que de células normais. A descoberta do papel funcional desses anticorpos mostrou a importância desses agentes terapêuticos, no entanto, limitados, em razão da impossibilidade de serem produzidos em larga escala. Inicialmente, pensou-se na hipótese de usar mielomas para produzir esses anticorpos. Porém, era preciso programar as células do mieloma para a produção de anticorpos com a especificidade de interesse. Esse objetivo foi alcançado na década de 1970, quando Kohlert e Milstein (1975) desenvolveram metodologia que resultou em uma técnica de seleção de anticorpos com especificidade definida em forma clonal, chamados então, de anticorpos monoclonais. A metodologia de geração de hibridomas (linhagem celular cultivada e formada pela fusão de células de mieloma com células linfócitos B produtoras de anticorpo desenvolvidas para produzir um anticorpo desejado em grande quantidade) foi descrita por Kohlert e Milstein, com a qual foram agraciados com o prêmio Nobel de Medicina em 1986, (figura 2). Essa metodologia possibilitou produzir anticorpos de interesse em grandes quantidades, as quais passaram a ser usados para vários fins, tais como: pesquisa básica (estrutura e função dos anticorpos), diagnósticos, terapia de câncer, radioterapia, inflamação e desordens do sistema imune. No entanto, ela apresentou alguns problemas em terapia, tornando o seu uso limitado, pois os anticorpos monoclonais podem induzir uma resposta que pode interferir com a terapia de interesse, causar alergia ou mesmo provocar uma hipersensibilidade. Desta forma, na terapia, o ideal seria utilizar anticorpos humanos. No entanto, anticorpos monoclonais humanos não são facilmente obtidos, pois a imortalização de linfócitos B humanos acarreta baixa produção de anticorpos (FRANKS *et al.*, 1990).

Formação de anticorpos monoclonais

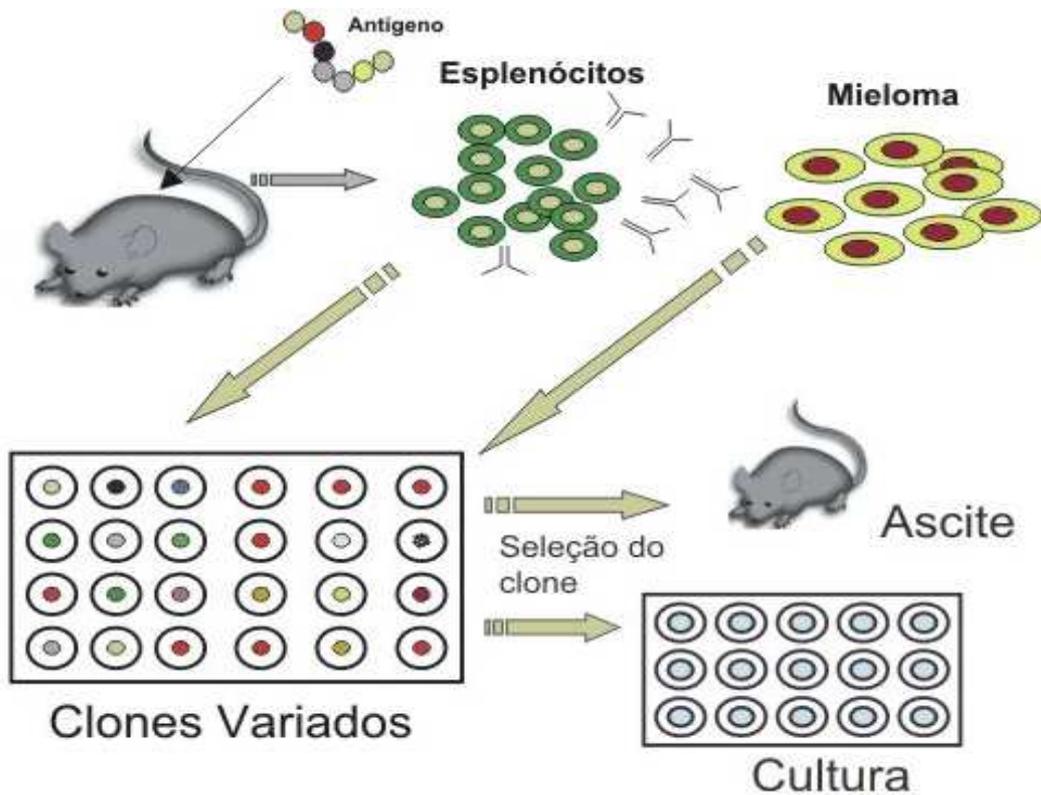


Figura 2 – Formação de anticorpos monoclonais
 Fonte: Thomaz Belo, 2002

Antes da descoberta da técnica do hibridoma, eram produzidos apenas anticorpos policlonais, o que requeria um grande número de animais imunizados e não se conseguia imortalizar as células produtoras de anticorpos. Assim, com a adoção da nova técnica, o número de animais usados em investigação reduziu-se, existindo ainda outras vantagens conferidas por essa técnica:

- a) alta especificidade;
- b) alta afinidade;
- c) determinação de um só epítipo de um antígeno;
- d) alta homogeneidade;
- e) ausência de anticorpos não específicos;
- f) maior facilidade de caracterização;

g) mínima variabilidade de lote para lote.

Assim como há vantagens, existem também desvantagens no uso dessa técnica:

- a) normalmente é extremamente cara;
- b) reconhecimento de um só epítopo de um antígeno; esse epítopo pode estar destruído (por exemplo, pela fixação), mesmo que exista a molécula total do antígeno.

Se o soro não for produzido contra um epítopo específico do antígeno que se quer detectar, e se existirem outros antígenos com esse epítopo, a imensa vantagem da alta especificidade será inútil. A mistura de hibridomas purificada é selecionada para identificação e isolamento de clones que secretam um anticorpo que interage com o antígeno desejado, o que geralmente é feito com a diluição da suspensão dos hibridomas, obtendo-se então os clones que secretam determinado anticorpo monoclonal por técnicas imunoquímicas (FRANKS et al., 1990).

2.3 Infiximabe

A terapia biológica é cada vez mais utilizada em pacientes portadores de artrite reumatoide juvenil, espondilite anquilosante e outras doenças inflamatórias. Existem três fármacos atualmente comercializados: etanercepte (100% humano), adalimumabe (100% humano) e infiximabe (25% murino e 75% humano) (figura 3).

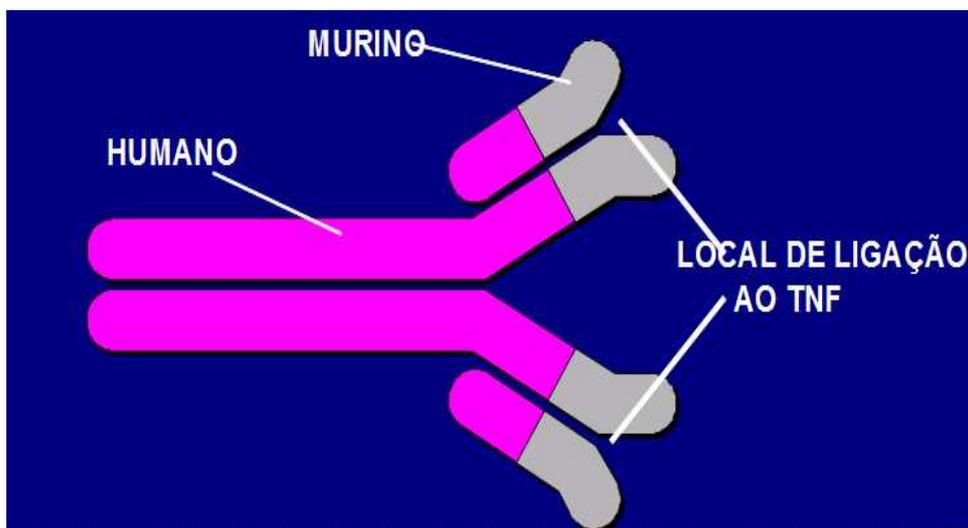


Figura 3 – Forma esquemática do infiximabe
Fonte: Knight DM, *et al.*, 1993

O uso desses medicamentos por via sistêmica é de grande valia para o tratamento de doenças inflamatórias e abre um amplo campo de pesquisa para sua utilização em doenças inflamatórias oculares, cujos primeiros resultados mostraram-se promissores. Dos três medicamentos, o infliximabe tem sido utilizado com maior frequência e com resultados mais encorajadores nas doenças retinianas (THEODOSSIADIS *et al.*, 2005).

Infliximabe (RemicadeTM Schering Plough, Brasil) é um anticorpo monoclonal quimérico humano e murino que se liga com alta afinidade às formas solúveis e transmembranas do TNF, inibindo a sua atividade funcional em vários tipos de bioensaios *in vitro*.

Desde a introdução dos antagonistas do TNF no tratamento da artrite reumatoide (YOEUM *et al.*, 2004) e doença de Crohn (AKOBENG *et al.*, 2004) no fim dos anos 1990, essa nova modalidade terapêutica tem sido utilizada com sucesso. O infliximabe liga-se fortemente a uma proteína especial no corpo chamada fator de necrose tumoral alfa que está envolvido com a inflamação. O infliximabe associa-se com alta afinidade a formas solúveis e transmembranas do TNF, inibindo a sua atividade funcional (STRUNK *et al.*, 2006).

O infliximabe previne o aparecimento de doenças em camundongos transgênicos que desenvolvem poliartrite e, quando administrado após o início da doença, promove a cura de articulações (DOUNI *et al.*, 2004). *In vivo*, o infliximabe forma rapidamente complexos estáveis com TNF humano, com perda da sua bioatividade.

Estudos adicionais evidenciaram que o tratamento com infliximabe reduz a infiltração de células inflamatórias em áreas afetadas do intestino e articulações, diminuindo também a aderência celular, a quimiotaxia e a degradação tecidual (figura 4).

Estima-se de que em 2006, mais de um milhão de pacientes por todo o mundo com artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriática e psoríase que estariam recebendo tratamento com antagonistas do TNF (CHEN YF *et al.*, 2006).

Doenças inflamatórias sistêmicas, incluindo as vasculites primárias e secundárias e condições granulomatosas inflamatórias, comumente afetam a esclera, úvea, córnea, retina e órbita e podem levar a danos visuais.

Embora os corticosteroides sistêmicos tenham sido a terapia de escolha para essas doenças, drogas imunossupressoras, tais como a ciclosporina, azatioprina e outras, usadas isoladamente ou combinadas, são necessárias para controlar os processos inflamatórios, às vezes em grandes doses, com efeitos colaterais graves (BALTATZIS *et al.*, 2003;

ROSENBAUM *et al.*,1988).

O uso de infliximabe nas doenças inflamatórias tem provado ser muito eficaz, e o seu uso por via intravítrea pode ser uma alternativa terapêutica de grande valia, com menos efeitos colaterais que aqueles obtidos com o uso de drogas por via sistêmica (RODRIGUES *et al.*, 2009). Novas drogas por via intravítrea estão cada vez mais sendo utilizadas com sucesso, na tentativa de substituição do uso da via sistêmica, como no tratamento da toxoplasmose ocular. Recente trabalho com uso de clindamicina e dexametasona no tratamento da toxoplasmose ocular mostrou resultados animadores (LASAVE *et al.*, 2010).

Neutralização do fator de necrose tumoral

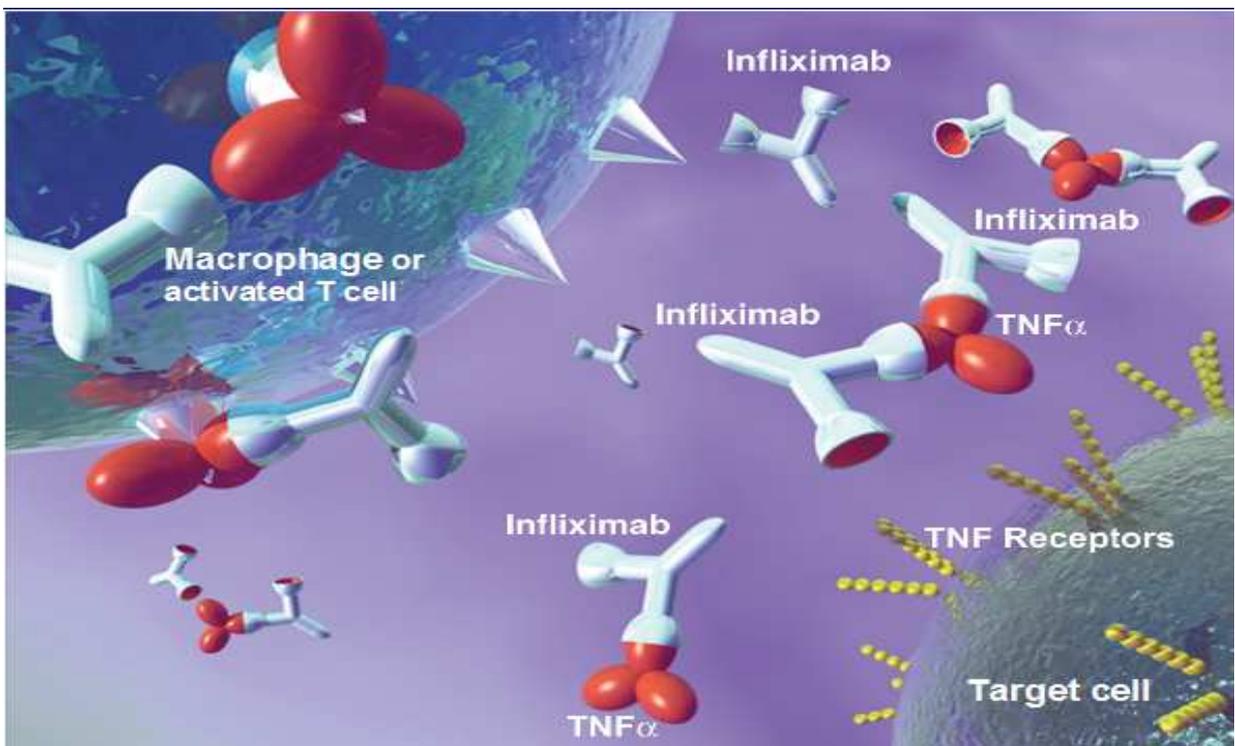


Figura 4 – Neutralização do fator de necrose tumoral
Fonte: Scallion BJ, *et al.*, Cytokine 1995

2.4 Infliximabe na retinopatia diabética

Evidências sugerem que a retinopatia diabética tem um componente inflamatório importante, manifestado por recrutamento e adesão de leucócitos aos vasos retinianos. A

morte das células endoteliais é o marco da retinopatia diabética, e a adesão de leucócitos está associada com a morte dessas células. A adesão leucocitária à vascularização retiniana diabética resulta em quebra da barreira hematorretiniana interna, não perfusão capilar, injúria e morte das células endoteliais. Diabetes induzida em ratos da raça Long Evans mostrou um aumento de duas a três vezes da adesão leucocitária retiniana (BAROUCH *et al.*, 2000).

Foi investigado o envolvimento de TNF nas mudanças histopatológicas em camundongos com diabetes induzida. Quando submetidos ao uso de substâncias anti-TNF, notou-se a supressão da lesão celular e da apoptose, diminuição da perda de pericitos e das células endoteliais. A retinopatia diabética tem uma fase inflamatória crônica, subclínica, responsável por muitas alterações vasculares com envolvimento e adesão de leucócitos aos vasos retinianos (JOUSSEN *et al.*, 2001; JOUSSEN *et al.*, 2004).

Estudos identificaram a importância do TNF na patogênese da retinopatia diabética (JOUSSEN *et al.*, 2009) e demonstraram que medicamentos anti-TNF podem ter um papel importante na redução de suas complicações. Pesquisas em animais com retinopatia diabética mostraram que a administração de inibidores de TNF reduziu a adesão leucocitária e inibiu a queda da barreira hematorretiniana (JOUSSEN *et al.*, 2002).

O TNF tem sido encontrado na matriz extracelular, endotélio e paredes vasculares do tecido fibrovascular de olhos com retinopatia diabética proliferativa (LIMB *et al.* 1996) e está elevado no vítreo de olhos com essa complicação (LIMB *et al.*, 1999). Conclui-se então que o TNF pode ter um papel potencialmente importante na neovascularização retiniana, como foi demonstrado em coelhos e camundongos, em estudos experimentais (MAJKA *et al.*, 2002).

Experimentos em coelhos mostraram que TNF é capaz de induzir a formação de neovasos *in vivo* em virtude de suas propriedades inflamatórias. Em modelos animais, a regressão de neovascularização após tratamento com anti-TNF tem sido demonstrada (SHI *et al.*, 2006).

Estudos em seis pacientes portadores de retinopatia diabética com edema macular associado foram tratados com infliximabe por via endovenosa (SFIKAKIS *et al.*, 2005), tendo havido melhora da acuidade visual e da espessura da retina medida pela tomografia de coerência óptica.

O uso de inibidor de TNF por via endovenosa mostrou-se benéfico em pacientes portadores de retinopatia diabética e degeneração macular relacionada à idade

(MARKLOMICHELAKIS *et al.*, 2005).

Além da retinopatia diabética, o TNF parece ter um papel em outras complicações da diabetes mellitus. Na nefropatia diabética, há elevação dos níveis de TNF nos rins e no sangue circulante (WONG *et al.*, 2007). Elevados níveis de TNF têm sido também associados à neuropatia diabética (GONZALES-CLEMENTE *et al.*, 2005).

2.5 Infiximabe nas uveítes

Uveíte, processo inflamatório que acomete a íris, corpo ciliar e coróide, quando não convenientemente tratada, pode levar à perda irreversível da visão e, em casos mais sérios, à atrofia do bulbo ocular. As uveítes são classificadas em infecciosas e imunomediadas, que podem estar associadas às doenças sistêmicas.

Uveítes não infecciosas são doenças autoimunes provocadas por ativação de macrófagos e linfócitos T, culminando em inflamações (FORRESTER *et al.*, 1992).

Estudos em animais e humanos sugerem que o TNF tem importante papel na iniciação e prolongamento da uveíte experimental (OKADA *et al.* 1998; LACOMB *et al.*, 2001; DICK *et al.*, 2004). O papel pró-inflamatório do TNF nas uveítes é também sustentado pela observação de que a injeção intraocular de TNF em coelhos induz à formação de uveíte (ROSENBAUM *et al.*, 1988; FLEISHER *et al.*, 1990).

Em humanos, elevados níveis de TNF têm sido demonstrados no humor aquoso de pacientes com uveíte (LACOMB *et al.*, 2001). Aumento dos níveis de TNF foram também encontrados em pacientes portadores de vasculites retinianas e oftalmia simpática (PALEXAS *et al.*, 1992). Portanto, uma droga que iniba a ação do TNF pode ser um grande agente terapêutico para pacientes com uveítes (NUSSENBLATT, 2005).

Em uveítes associadas a doenças sistêmicas (doença de Behçet, artrite reumatoide, sarcoidose), em que se utiliza infiximabe por via endovenosa, os resultados são bastante promissores (SFIKAKIS *et al.*, 2004; KAHN *et al.*, 2006).

Na uveíte autoimune experimental, o processo inflamatório é mediado pelo TNF, que desencadeia a infiltração leucocitária pela regulação de adesão de moléculas, maturação e sobrevivência celular, ativação de macrófagos e respostas das células T helper (NAKAMURA *et*

al., 1994).

Os bloqueadores do TNF podem suprimir lesões retinianas em uveítes autoimunes experimentais (DICK *et al.*, 2004; DOUNI *et al.*, 2004).

Estudo clínico demonstrou que a concentração de TNF apresenta-se aumentada no soro e no humor aquoso de pacientes portadores de doença de Behçet, especialmente durante a maior atividade da doença (CHRONOPOULOU *et al.*, 2001).

Remissões do processo inflamatório têm sido relatadas com o uso de infliximabe endovenoso em casos de uveítes posteriores refratárias a tratamento por medicamentos convencionais. A maioria dos pacientes demonstrou remissão das uveítes uma ou duas semanas após a primeira ou a segunda infusão. Outros necessitaram de três a sete infusões endovenosas (JOSEPH *et al.*, 2003).

Cinco pacientes portadores de uveíte associada à doença de Behçet foram tratados com infliximabe por via endovenosa e a melhora do processo inflamatório ocular tornou-se evidente em 24 horas. Uma completa supressão do processo ocorreu 7 dias após o início do tratamento em todos os pacientes (SFIKAKIS *et al.*, 2001).

Um paciente portador de uveíte associada à doença de Behçet, que não apresentou melhora com uso de corticoides e ciclosporina, foi tratado com uma única dose intravenosa de infliximabe com melhora da visão e remissão do quadro inflamatório (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 2001).

Em estudos com pacientes portadores de uveíte posterior e edema macular cistoide, o uso de infliximabe mostrou resolução do edema com uma ou duas injeções intravenosas (MARKOMICHELAKIS *et al.*, 2004).

A administração endovenosa de infliximabe a longo ou curto prazo tem sido tolerada em maior parte dos pacientes com doença de Behçet. Aumento da pressão intraocular, catarata e infecções intraoculares não têm sido observados (SFIKAKIS *et al.*, 2001).

Seis crianças com artrite reumatoide juvenil e uveíte associada, que não eram controladas com a terapia convencional, foram tratadas com infliximabe. Em todos estes pacientes houve melhora da uveíte com controle da pressão intraocular (RICHARD *et al.*, 2005). Similarmente, em outras seis crianças com envolvimento ocular bilateral, houve redução do processo inflamatório com uso de infliximabe endovenoso (RAJARAMAN *et al.*,

2006). Aproximadamente, 40% de pacientes com HLA-B27 e espondilite anquilosante, artrite reativa e psoriática, que apresentavam uveíte anterior de início súbito, melhoraram com uso endovenoso de infliximabe (ROSENBAUM *et al.*, 2002).

Em um estudo com sete pacientes com HLA-27, associada com o início súbito de uveíte anterior, uma simples dose de infliximabe endovenoso provou-se efetiva, e todos os pacientes responderam imediatamente com remissão do quadro (EL-SHABRAWI *et al.*., 2002). Resultados similares têm sido observados em casos esporádicos de uveítes resistentes a tratamento convencional, associados com espondilopatia (BODAGHI *et al.*, 2005) ou doença de Crohn (RISPO *et al.*, 2005).

Em outro estudo em 717 pacientes portadores de espondilite anquilosante que usaram infliximabe ou etanercepte, notou-se que o uso de anti-TNF causou substancial prevenção do aparecimento de uveíte anterior e os melhores resultados foram alcançados com o uso de infliximabe (BRAUN *et al.*, 2005).

Etanercepte, outro inibidor anti-TNF, tem sido usado no tratamento de uveítes refratárias com variável sucesso (REIFF *et al.*, 2001), sendo que, em alguns pacientes, ele mostra também eficácia em prevenir recidivas em uveítes não controladas com metotrexate (FOSTER *et al.*, 2003).

Relata-se que a habilidade do infliximabe em alvejar a membrana ligada ao TNF, além de sua solubilidade, poderia explicar sua melhor eficácia do que a do etanercepte no tratamento de uveítes (GALOR *et al.*, 2006).

Dados sugerem que, em pacientes com uveítes recidivantes que respondem mal ao tratamento convencional, o uso de infliximabe tem uma resposta melhor do que etanercepte e deve ser considerado como primeira linha de terapia (THEODOSSIADIS *et al.*, 2007).

O primeiro trabalho publicado com o uso de infliximabe intravítreo, na dosagem de 1,5mg/0,15 ml, em dez olhos de sete pacientes portadores de uveíte crônica não infecciosa com significativa perda da acuidade visual e edema de mácula (FARVARDIN *et al.*, 2010) mostrou melhora acentuada na acuidade visual e diminuição na espessura macular.

Na literatura, o uso de infliximabe em outras doenças inflamatórias oculares tem sido relatado com sucesso. Um caso de síndrome de fibrose difusa sub-retiniana refratária ao tratamento com imunossupressor foi tratado com sucesso com uso de infliximabe endovenoso (ADAN *et al.*, 2007). Sete pacientes portadores de inflamação recorrente idiopática da órbita

(miosite orbitária crônica), que não melhoraram com uso de terapia tradicional com corticosteroides, radioterapia e outros agentes antiinflamatórios, tiveram uma resposta favorável após o uso de infliximabe endovenoso (GARRITY *et al.*, 2004).

2.6 Infliximabe na degeneração macular relacionada à idade

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença degenerativa crônica, que afeta primariamente a coriocapilar, a membrana de Bruch e o epitélio pigmentar da retina. É a causa mais comum de cegueira legal nos países mais desenvolvidos, sendo mais frequente em pacientes idosos, caucasianos, com íris de olhos claros e tabagistas. Outros fatores de risco são ainda pouco conhecidas (BIRD, 2003).

Há dois subtipos desta doença, a atrófica (seca) e a neovascular (úmida), e ambas podem levar a uma significativa perda da visão. Embora a úmida represente somente 10% a 15% do total, ela é responsável por mais de 80% dos casos de perda grave da visão (BIRD *et al.*, 1995).

A posição anatômica adequada entre a retina, o epitélio pigmentar e a membrana de Bruch é crucial para o suporte nutricional dos fotorreceptores, metabolismo retiniano, fagocitose do segmento externo dos fotorreceptores e formação da barreira hematorretiniana externa e, assim, para uma boa função visual. (ZAYIT-SOUDRY *et al.*, 2007). Tem sido demonstrada uma relação direta entre idade e espessura da membrana de Bruch, e o aumento da espessura revelou ser secundário ao acúmulo de restos de produtos e depósitos de lipídios, bem como um aumento do conteúdo do colágeno (GREEN *et al.*, 1985; RAMRATTAN *et al.*, 1994).

A presença de drusas é considerada a manifestação clínica primordial da degeneração macular relacionada à idade. As drusas são usualmente discretas, redondas, levemente elevadas, variáveis em tamanho, localizadas sobretudo na mácula e polo posterior, bilateralmente. As drusas são depósitos de material de composição complexa, principalmente lipídico, entre as membranas basal do epitélio pigmentar e colágena interna da membrana de Bruch (GASS, 1997). Drusas mudam de forma e consistência com o passar da idade e tendem a aumentar em número. Elas podem tornar-se calcificadas e cristalinas na aparência (BARONDES *et al.*, 1990).

A maioria dos pacientes, nessa fase seca, tem acuidade visual normal ou levemente diminuída. No entanto, alguns se queixam de dificuldade de leitura e discreta metamorfopsia. Os testes eletrorretinográficos, na maioria dos pacientes, são normais. (FISHMAN *et al.*, 1976).

A DMRI úmida caracteriza-se pela formação de neovascularização de coroide (NVC). Vários estudos têm evidenciado que mecanismos inflamatórios locais podem provocar dano ao epitélio pigmentar e à membrana de Bruch e levar a um rompimento da ligação anatômica normal (OH *et al.*, 1999; ANDERSON *et al.*, 2002).

Envolvimento inflamatório tem sido demonstrado em estudos de tecido de NVC retirado cirurgicamente em pacientes portadores de DMRI. (DASTGHEIB *et al.*, 1994). Sugere-se que o crescimento de NVC ocorre por ativação de macrófagos e outras células inflamatórias que secretam enzimas e citocinas que degradam a membrana de Bruch (KILLINGWORTH *et al.*, 1990; HUTCHINSON *et al.*, 1993).

A introdução de agentes antifatores de crescimento vascular endotelial por via intravítrea no tratamento da DMRI marcou um grande avanço no tratamento dessa condição (VEDULA *et al.*, 2008). Além disso, está ganhando evidência o papel de um sistema imune ativado em DMRI (NUSSENBLATT *et al.*, 2007). Estudos têm mostrado que o TNF tem sido encontrado em NVC de olhos com DMRI (OH *et al.*, 1999), bem como em membranas epi-retinianas, vítreo e fluido sub-retiniano de coelhos com retinopatia proliferativa (ARMSTRONG *et al.*, 1998). Recentemente foi relatada uma possível associação entre o TNF e a DMRI úmida em uma população de Taiwan (LEI WAN *et al.*, 2010).

Várias linhas de evidência sugerem que a inter relação entre o TNF e seus receptores são importantes para a regulação das atividades das células do epitélio pigmentar da retina, incluindo ligações celulares, quimiotaxia, migração e proliferação. Também, a expressão de vários fatores apoptóticos nas células do epitélio pigmentar em doenças como DMRI e proliferação vítreo retiniana é regulada pelo TNF (YANG *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2005). Portanto, uma droga que interfira com a interação TNF-TNF receptor pode representar um novo tipo de tratamento para pacientes com neovascularização de coroide em DMRI.

O uso de infliximabe sistêmico para artrite crônica, em três pacientes idosos que coincidentemente apresentavam também DMRI, resultou em regressão de NVC clássicas (MARKOMICHELAKIS *et al.*, 2005).

Estudos em nove pacientes com psoríase mostrou que infliximabe, além de reduzir o processo inflamatório, mostrou também, mediante análises histoquímicas, mudanças nos vários fatores envolvidos na angiogênese e redução do VEGF (CANETE *et al.*, 2004).

2.7 Efeitos colaterais do uso de infliximabe por via endovenosa

A inibição da ação do TNF compromete a defesa do organismo contra bactérias e vírus, aumentando a possibilidade de doenças infecciosas, embora estudos não mostrem aumento significativo de infecções em paciente em uso desse medicamento (HYRICH *et al.*, 2004).

Como o infliximabe contém 25% de proteínas de camundongo, ele é imunogênico e pode induzir a formação de anticorpos antiquméricos (MOHAN *et al.*, 2001).

O importante papel do TNF na regulação de função celular e na apoptose de células T potencialmente auto-reativas pode também estar ligado à auto-imunidade que surge em alguns pacientes tratados com infliximabe. Além disto, a neutralização *in vivo* do TNF pode promover auto-imunidade humoral por prevenir a indução de células T citotóxicas (VIA *et al.*, 2001). O desenvolvimento de anticorpos antinucleares é um achado comum nesses pacientes e auto-anticorpos podem geralmente aparecer (CHARLES *et al.*, 2000).

O uso de infliximabe em pacientes com artrite reumatoide aumenta o risco de desenvolvimento de anticorpos antinucleares em até 80%. Pacientes podem também desenvolver anticorpos antiquméricos humanos (HACA) e murinos (WONG *et al.*, 2008).

Pacientes que desenvolvem uma reação à infusão têm maior risco de ter HACA e infliximabe parece ter menor efeito em pacientes que desenvolvem este tipo de anticorpos (HARAOUI *et al.*, 2006).

Quando o infliximabe é utilizado por via endovenosa em altas doses, paradoxalmente, há uma menor chance do aparecimento de HACA (WONG *et al.*, 2008). A frequência do aparecimento de auto-anticorpo nesses pacientes está relacionada com a dose e o tempo de tratamento, ou com ambos. Dependendo do método utilizado para análise, esses anticorpos têm sido detectados em 15-40% dos pacientes tratados com infliximabe. Altos títulos desses

anticorpos têm sido associados com a perda de eficácia e reações de hipersensibilidade (HARAOUI *et al.*, 2006).

Uma reação aguda à infusão ocorreu em 5% dos pacientes durante a administração endovenosa de infliximabe. A reação aguda é similar àquela com infusões intravenosas de imunoglobulina e é provável ser multifatorial e provocar dor de cabeça, febre, tremores, prurido, vermelhidão, urticária, sintomas torácicos, náuseas e vômitos, mialgia, eritema, desconforto abdominal, dor de garganta e fraqueza (DIAMANTI *et al.*, 2002).

Não é surpreendente que, por comprometer o importante papel do TNF na defesa do hospedeiro, os tratamentos com anti-TNF por via endovenosa, sobretudo em doses prolongadas, possam produzir efeitos colaterais sérios.

Têm sido relatados, além da formação de anticorpos, o aparecimento de doenças autoimunes, doenças desmielinizantes (MOHAN *et al.*, 2001), propensão para infecções, como tuberculose (KEANE *et al.*, 1999), toxoplasmose (ELLERIN *et al.* 2003), listeriose (SLIFMAN, 2003), neutropenia e trombocitopenia, neuropatia óptica anterior bilateral (FOOROZAN *et al.*, 2002), aumento de risco de malignidade (SMITH *et al.*, 2001), desenvolvimento de linfoma (BROWN *et al.*, 2002).

2.8 Eletroretinografia

O eletroretinograma (ERG) representa uma resposta elétrica generalizada das células da retina, tanto neural como não neural. A resposta ocorre como resultado das mudanças geradas pelo estímulo luminoso que provoca alterações iônicas (principalmente sódio e potássio), no espaço extracelular e por consequência na função elétrica. Esta resposta gerada poderá ser quantificada e analisada conforme sua morfologia. A onda elétrica registrada corresponde à diferença de potencial entre este eletrodo e um eletrodo de referência, que pode estar contido na própria lente de contato (lente bipolar) ou em contato com qualquer lugar da pele, geralmente na fronte ou no lobo da orelha, quando é utilizado lente monopolar. Pode ser realizado em todos os vertebrados e muitos invertebrados (FRISHMAN *et al.*, 2006).

É um dos poucos métodos não invasivos para testar funções elétricas das células da retina. Esse exame eletrofisiológico auxilia no diagnóstico das patologias oculares, muitas vezes precedendo alterações anatômicas encontradas no exame de fundo de olho. Também

apresenta aplicação prática no seguimento de doenças retinianas e quantificações nos danos estruturais e funcionais provocados por drogas citotóxicas, doenças inflamatórias e traumas. Sua aplicação na clínica oftalmológica começou em 1941, quando foi desenvolvido um eletrodo em forma de lente de contato, específico para utilização na eletrofisiologia. Os eletrodos estão cada vez mais aprimorados e o uso do ERG na prática clínica vem sendo ampliado. Atualmente existem vários tipos de eletrodos que podemos utilizar para mensurar o ERG, sendo os mais utilizados o Burian- Allen, Goldlens e DTL-Plus (Dawson-Ttick-Litzkow).

As principais indicações incluem pacientes com sintomas de cegueira noturna, fotofobia, nistagmo, baixa de visão a ser esclarecida, além de acompanhamento de efeitos de drogas tóxicas para a retina como cloroquina e tamoxifeno. É muito útil para diagnóstico de doenças retinianas hereditárias, como retinose pigmentar e distrofia de cones e bastonetes (SACAI *et al.*, 2003).

O ERG permite um grande auxílio no diagnóstico diferencial entre defeitos funcionais no sistema de cones e bastonetes, entre disfunção de cegueira congênita estacionária e degenerações tapeto-retinianas progressivas. Em algumas doenças retinianas, como acromatopsia, distrofia de cones progressiva e disfunções retinianas por agentes tóxicos, as respostas do ERG apresentam comprometimento antes que alterações fundoscópicas sejam evidenciadas (FISHMAN *et al.*, 2000).

O comprometimento do ERG no processo inflamatório da retina, trauma ocular e retinopatia diabética está na dependência da extensão e profundidade do envolvimento retiniano, uma vez que se houver um comprometimento apenas setorial da retina o ERG não apresentará alterações por refletir uma resposta difusa.

A nomenclatura mais utilizada pela International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) é (figura 5):

Onda a ou componente a: representa a primeira deflexão negativa. É mensurada da linha de base até o vale negativo. Tem origem na hiperpolarização dos fotorreceptores.

Onda b ou componente b: representa o primeiro pico positivo. É mensurada da onda a até o pico da onda b (pico-a-pico). Gerada na camada nuclear interna, provavelmente pelas células de Müller, e indiretamente pela atividade da célula bipolar.

Onda c ou componente c: representa o prolongamento do componente positivo (onda b). Não é muito utilizado.

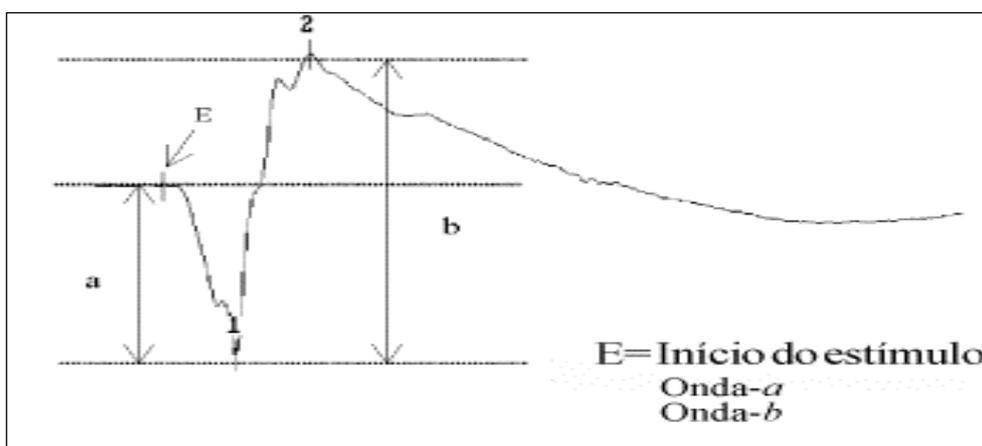


Figura 5 – Método utilizado para determinação da amplitude de onda a e b
 Fonte: PEREIRA *et al.*, Arq. Bras. Oftalmol. v. 66, n. 2, 2003.

A ISCEV recomenda um protocolo padrão para realização do ERG de campo total em humanos composto de 5 passos citados abaixo e duas fases: escotópica e fotópica, precedidos pela dilatação da pupila e adaptação ao escuro de 20 a 30 minutos.

- a) resposta de bastonetes
- b) resposta máxima (bastonetes e cones)
- c) potenciais oscilatórios
- d) resposta de cones
- e) resposta ao flicker 30Hz.

Os potenciais oscilatórios podem ser obtidos na fase escotópica ou na fotópica. Antes de realizar a fase fotópica é necessária nova adaptação, desta vez ao claro, de 10 minutos.

2.9 Retina do coelho

A retina do coelho apresenta peculiaridades que a torna diferente anatomicamente da humana. Não há mácula na retina do coelho, mas uma área mais sensível, denominada estria visual. Ela tem de 3 a 4 mm de amplitude, e seu centro está localizado cerca de 3 mm abaixo da papila. Esta área não é usualmente visível com o oftalmoscópio, embora histologicamente ela evidencie marcada diferença do resto da retina (DAVIS, 1929).

A estrutura histológica da retina é essencialmente a mesma do olho humano, com alguns detalhes diferentes. A espessura é bastante uniforme, embora relativamente mais

espessa na área das estrias visuais, ao passo que na área das fibras meduladas e perto da ora serrata ela se torna muito mais fina.

A estria visual mostra grande diferença com o restante da retina. Os cones e bastonetes são mais longos, a camada nuclear externa e interna são mais espessas, e as células ganglionares mais numerosas (DAVIS, 1929).

Sob os raios medulares, os cones e bastonetes são mais curtos, as camadas nuclear externa e interna tornam-se mais finas, e a camada de células ganglionares é reduzida a poucas células isoladas. As camadas gradualmente tornam-se mais finas assim que há aproximação da periferia da retina.

As células do epitélio pigmentar são irregulares em tamanho. Há células maiores, com dois núcleos, e outras menores, com um único núcleo. São irregulares na disposição anatômica, ao passo que as humanas são regularmente hexagonais.

Os grânulos de pigmento são fusiformes, nos humanos são redondos. Os cones e bastonetes são extremamente longos e finos. Os núcleos dos cones são maiores, muito poucos, e estão em contato com a camada limitante externa. As células de Muller são muito proeminentes.

A papila, quando vista oftalmoscopicamente, mostra uma escavação profunda e é horizontalmente oval, as margens são indistintas particularmente nasal e temporalmente, em virtude dos feixes de fibras meduladas que deixam a papila nessas margens.

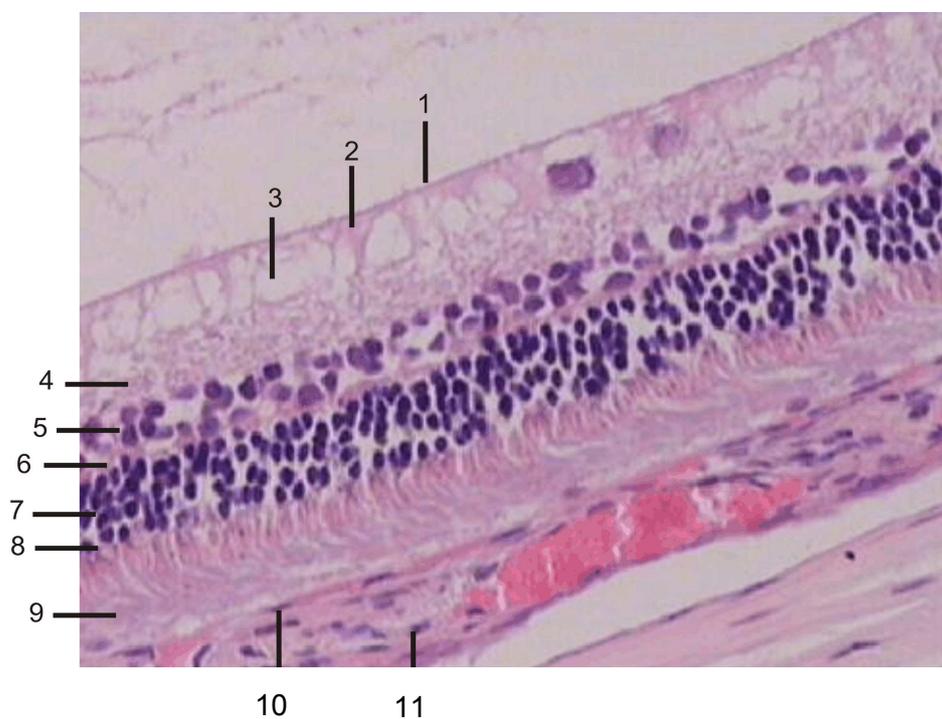
A escavação é mais profunda em razão de a abertura escleral ser maior do que o nervo, de modo que não há fibras suficientes para preencher a abertura. A coróide é bem desenvolvida no coelho. Sua estrutura histológica é a mesma da humana (CRAIGIE, 1948).

Na preparação das peças para avaliação histológica da retina do coelho normal, alterações podem ocorrer. São os chamados artefatos, que devem ser distinguidos das alterações tóxicas provocadas por qualquer tipo de medicamento. A inclusão em parafina, por exemplo, eleva a temperatura da peça em mais de 70° C, o que pode levar à disrupção dos segmentos externos dos fotorreceptores semelhante ao que se observa em um descolamento de retina.

Algumas alterações são artefatos produzidos durante a fixação das peças como vacuolização leve ou moderada por edema celular *post-mortem* e discreta separação do

segmento externo dos fotorreceptores (SMITH RS *et al.*, 2000). A presença da separação da retina sensorial do epitélio pigmentar pode ser devido a um descolamento de retina prévio à enucleação, ou então a um artefato durante a preparação da peça. A presença de atrofia do segmento externo e de células inflamatórias no espaço sub-retiniano afasta um artefato de preparação da peça (figura 6).

Histologia da retina do coelho



1. Membrana limitante interna
2. Camada de fibras nervosas
3. Camada de células ganglionares
4. Camada plexiforme interna
5. Camada nuclear interna
6. Camada plexiforme externa
7. Camada nuclear externa
8. Camada limitante externa
9. Camada dos cones e bastonetes
10. Camada do epitélio pigmentar
11. Estroma da coróide

Figura 6 – Histologia da retina do coelho
 Fonte: Rassi, A, arquivo pessoal, 2011

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram assim definidos:

Geral:

A Analisar a possível existência de toxicidade à retina sensorial, ao epitélio pigmentar e à coroide pela interpretação conjunta dos exames clínicos, eletrofisiológico e anatomopatológico após injeções seriadas de infliximabe.

Específicos:

B avaliar se injeções seriadas intravítreas de infliximabe provocam alterações, no exame clínico das estruturas oculares de coelhos;

C avaliar se as injeções seriadas intravítreas de infliximabe provocam alterações na eletrofisiologia da retina de coelhos;

D avaliar se as injeções seriadas intravítreas de infliximabe provocam alterações histológicas na retina e coroide de coelhos.

4 MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, e todos os animais foram tratados de acordo com o estatuto para uso de animais em pesquisa da visão e oftalmologia da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Foram incluídos 15 coelhos albinos da raça New Zealand cujo peso variou entre 3.500 e 4.500 gramas. Dez coelhos eram do sexo masculino e cinco do sexo feminino.

Antes de iniciar os estudos, os coelhos foram colocados em quarentena sob supervisão de uma médica veterinária, e somente após avaliação das condições de sua saúde, foram submetidos ao estudo proposto.

Os coelhos foram mantidos durante todo o estudo no biotério central da Universidade Federal de Goiás, em uma sala exclusiva, sob a supervisão de um médico veterinário.

Alimentados com ração balanceada à base de purina, conforme orientação do veterinário, os coelhos foram mantidos em uma sala com ar condicionado, em um ciclo de 12 horas dia-noite, sob cuidados de um biólogo especializado, contratado somente para essa finalidade .

Os coelhos foram colocados em gaiolas metálicas individuais, medindo 40 x 45 x 60 cm, com alimentação e água. As gaiolas eram higienizadas diariamente (figura 7).



Figura 7 – Alojamento dos coelhos
Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2010

4.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no projeto coelhos albinos, após serem submetidos a exames clínicos pelo médico veterinário, em que não foi constatada qualquer tipo de doenças infecto-contagiosa ou sistêmica, e cujos exames oftalmológicos e eletrorretinográficos revelaram-se normais. A presença de qualquer doença sistêmica ou oftalmológica serviu como critério de exclusão.

Todos os animais, antes do início do trabalho, foram submetidos a exame oftalmológico, com dilatação das pupilas, com uso de gotas de tropicamida a 1% (Midriacyl, Alcon) e ciclopentolato de sódio a 1% (Cicloplégico, Alergan).

Foi feita aplicação de duas gotas de moxifloxacino (Vigamox, Alcon) e os animais foram então submetidos a anestesia, para prosseguimento dos estudos.

4.2 Anestesia

Os animais foram anestesiados por um médico veterinário com especialização em anestesia animal, com associação de 3,0 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2% (Calmiuntm) e

25 mg/kg de cetamina (Ketaminatm), administrados por via intramuscular.

Durante o período em que os animais permaneceram sob efeito anestésico, realizou-se oxigênio terapia a 100% e foi colocada uma placa de identificação em seu lobo auricular. Foram então submetidos a exame clínico oftalmológico do segmento anterior e, ainda, a exame de fundo de olho com lente condensadora de 20 dioptrias. Caso houvesse constatação de alterações corneanas, cristalínianas e vítreo retinianas, os coelhos seriam excluídos do estudo.

Foi então realizado o exame de eletrorretinografia em ambos os olhos. Todos os olhos receberam injeção intravítrea de 0,06 ml ou de solução salina balanceada (BSS) ou de solução dissolvida de infliximabe de 2 mg.

Quatro olhos foram submetidos à injeção de BSS e vinte olhos a duas ou três aplicações da solução de infliximabe em intervalos mensais.

O infliximabe foi reconstituído com 3 ml de solução salina, tendo sido injetado em cada olho 0,06 ml da solução assim formada, na dosagem de 2 mg de infliximabe intravítreo com agulha de insulina 26G (Nitro Medical, Br) posicionada a 2 mm do limbo córneo-escleral (figura 8).



Figura 8 – Aplicação de infliximabe intravítreo
Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

Após a injeção, foram instiladas duas gotas de colírio de moxifloxacino (Vigamoxtm)

por mais três vezes durante todo o dia. Os coelhos foram examinados diariamente durante a primeira semana, para detecção de possível endoftalmite.

Trinta dias após, os coelhos foram novamente submetidos à anestesia, exame clínico oftalmológico e oftalmoscopia binocular. Foram feitas novas aplicações intravítreas, sendo quatro olhos submetidos a segunda aplicação de BSS e, nos outros vinte olhos, a segunda aplicação de solução de infliximabe.

Sessenta dias após o primeiro procedimento, os coelhos foram anestesiados, examinados novamente e submetidos a terceira aplicação de BSS em dois olhos, e em dez olhos, a uma terceira aplicação de infliximabe intravítreo.

Noventa dias após o início do experimento, os coelhos foram submetidos a nova anestesia, exame oftalmológico do segmento anterior e exame de fundo de olho com oftalmoscopia binocular indireta (figura 9) bem como a nova avaliação eletrorretinográfica.



Figura 9 – Coelho sendo submetido a exame de fundo de olho
Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

4.3 Exames eletrofisiológicos

Os olhos dos coelhos foram dilatados com uma solução de tropicamida a 1% e ciclopentolato de sódio a 1% e adaptados à escuridão na sala de exames. Os animais foram então posicionados corretamente no aparelho e submetidos aos exames eletrorretinográficos

(figura 10).



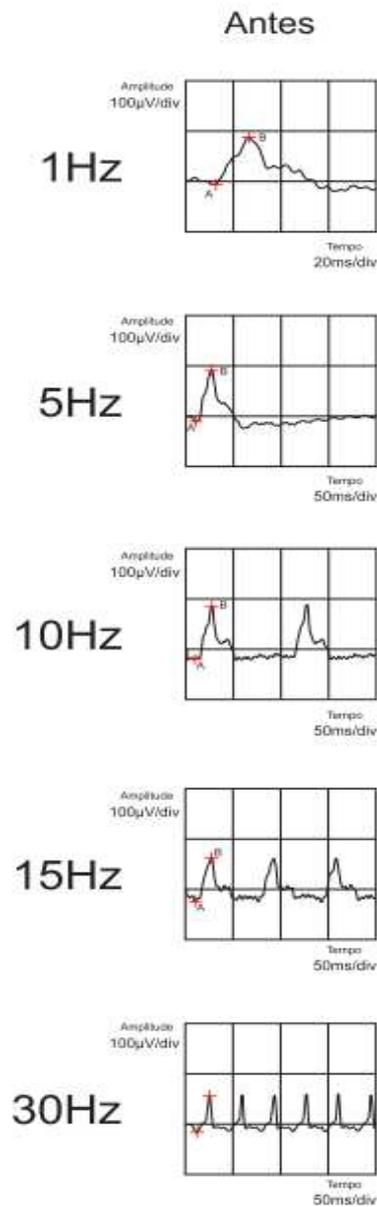
Figura 10 – Coelho sendo submetido a exame eletrorretinográfico
Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

Foi realizado eletrorretinograma em todos os coelhos, após adaptação ao claro por dez minutos, com luz de fundo da cúpula constante. O exame foi gravado no aparelho Roland Consult (Alemanha), com Ganzfeld computadorizado, modelo Q450, em mesa adaptada especialmente para exames de animais e que mantém a temperatura constante. Foi utilizado eletrodo de contato corneal tipo Gold ERG JET unipolar, adaptado para animais, com diâmetro de 11 mm. O eletrodo (tipo agulha) negativo estava localizado na língua, e o terra, no pavilhão auricular. A impedância foi mantida igual ou inferior a 5 KOhm. Todos os estímulos foram repetidos três vezes com *flashes* fotópicos nas frequências Hertz (0,5 Hz, 1,0 Hz, 2 Hz, 3 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 15 Hz, 30 Hz), variando de intensidade entre -2,50 a +0,5 cds/m². O sinal biológico foi amplificado e filtrado com banda de passagem passa-alto e passa-baixo. O tempo de análise foi 20 ms/div para 1,0 Hz e de 50 ms/div para as frequências de 5 Hz, 10 Hz, 15 Hz, 30 Hz.

Foram analisadas as amplitudes (uw) pico a pico das ondas e tempo de latência (ms). As respostas foram analisadas nas frequências de 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2 Hz, 3 Hz, em amplitudes de 100 microvolts/div e latência de 50 ms/div, e as frequências de 5 Hz, 10 Hz, 15 Hz, 30 Hz, em amplitudes de 100 microvolts/div e latência de 20 ms/div. (figura 11).

Seguindo o mesmo padrão de estudo piloto (GIANSANTI *et al.*, 2008) as mudanças eletrorretinográficas poderiam ser consideradas alteradas se houvesse uma diferença acima de

30% na amplitude das ondas a e b, entre os exames realizados antes das aplicações e aqueles



realizados noventa dias após.

Figura 11 – Exame eletroretinográfico antes das injeções de infliximabe. Ondas a e b com amplitude e latência normais. Ondas analisadas nas frequências de 0,5 Hz, 1,0 Hz, 2 Hz, 3 Hz, em amplitudes de 100 microvolts/div e latência de 50 ms/div, e as frequências de 5 Hz, 10 Hz, 15 Hz, 30 Hz, em amplitudes de 100 microvolts/div e latência de 20 ms/div.

Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

4.4 Eutanásia

Para a eutanásia, os animais ainda sedados em um nível moderado pelo uso de cloridrato de xilazina a 2%, foram submetidos a uma solução 50 mg/kg de tiopental sódico diluído a 2,5% por via endovenosa.

Sob profunda anestesia geral, administrou-se uma injeção de cloreto de potássio a 10%. A eutanásia foi confirmada após a constatação da ausência de batimentos cardíacos e movimentos respiratórios. Após a enucleação, os coelhos foram encaminhados para a Faculdade de Medicina Veterinária da UFG, onde foram cremados.

4.5 Exame anatomopatológico

Depois de constatada a morte, os coelhos foram submetidos a enucleação e, após a retirada dos olhos, estes foram colocados em solução balanceada de formol a 10% em frascos codificados para não permitir a sua identificação pelo patologista.

Após convenientemente embalados pela empresa transportadora, os olhos foram encaminhados, por via aérea, ao Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo para exame. Antes do exame macroscópico foram colocados em etanol a 70% por 24 horas. Foram, em seguida, submetidos a cortes com navalha, de modo a ser retirada uma fatia mediana circular de aproximadamente 3 mm de espessura, representando desde a córnea até o nervo óptico. Essas fatias foram submetidas ao processamento rotineiro para inclusão em parafina. Após esta inclusão, foram feitos cortes em micrótomos na espessura de 5 micrômetros. Os cortes aderidos em lâminas foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (MICHALANY, 1981).

4.6 Exame microscópico

Os cortes corados pela hematoxilina-eosina foram examinados em microscópio óptico Olympus BX40, com aumentos de 40, 150, 200 e 400 vezes. As lâminas foram fotografadas com câmera digital acoplada ao microscópio.

4.7 Método estatístico

Para a avaliação estatística das alterações eletrofisiológicas realizadas antes das injeções e trinta dias após as últimas injeções intravítreas, primeiramente realizou-se o teste de homogeneidade de variância (teste F de homogeneidade de variância). Quando não foram encontradas diferença de variâncias, utilizou-se o teste t pareado para efetuar as comparações entre as visitas. Nos estudos estatísticos dos achados anatomopatológicos, foi realizado o teste exato de Fisher.

5 RESULTADOS

Do total de quinze coelhos, três foram excluídos do projeto em razão de morte, sendo um no primeiro dia de trabalho, por parada respiratória pós-anestesia. O segundo coelho morreu quinze dias após, por infecção intestinal, e o terceiro depois de quarenta dias, por infecção pulmonar. Nenhuma dessas mortes foi relacionada com o uso da medicação em estudo.

5.1 Resultados dos exames eletrorretinográficos

Nas avaliações das ondas a e b não foram encontradas diferenças significativas tanto na morfologia quanto na amplitude das ondas. O eletrorretinograma revelou a presença de ondas detectáveis durante todo o exame em todos os grupos, com resposta normal em relação à amplitude e também ao tempo implícito das ondas a e b. Essas respostas ocorreram no exame inicial e noventa dias após a injeção de infliximabe e BSS em todos os grupos. Em nenhum momento houve redução significativa ou ausência de resposta ao eletrorretinograma pelo estímulo utilizado. A medida das ondas a e b não revelou alterações morfológicas e funcionais em nenhum dos grupos (grupo controle, grupo de duas aplicações e grupo de três aplicações de infliximabe).

Os exames eletrorretinográficos mostraram amplitudes em média 12% menores do que aquelas obtidas antes do tratamento, porém sem diferenças estatisticamente significantes, comparando-se a amplitude ou o tempo implícito entre os achados eletrorretinográficos pré e pós-tratamento (figura 12).

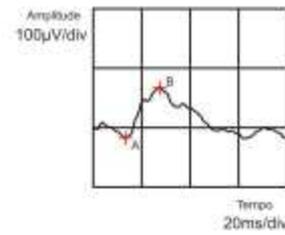
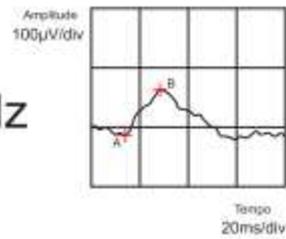
Aplicação de BSS

(3 aplicações de BSS)

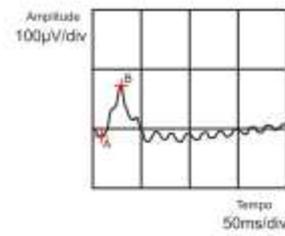
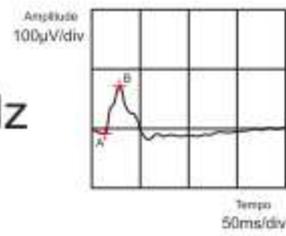
Antes

90 dias após

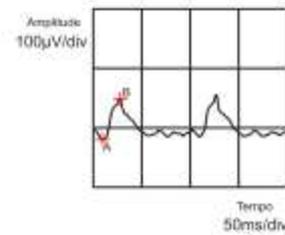
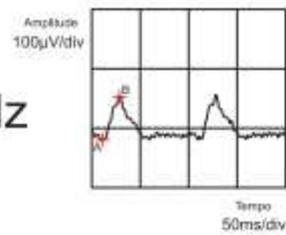
1Hz



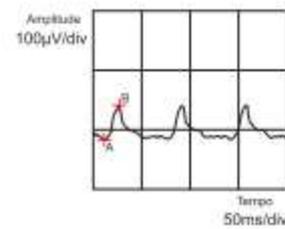
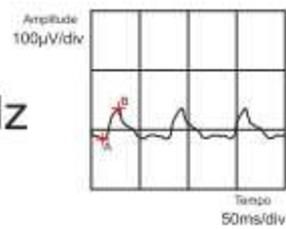
5Hz



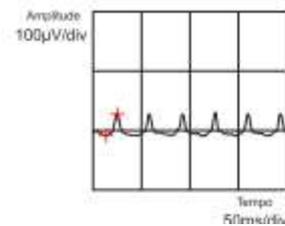
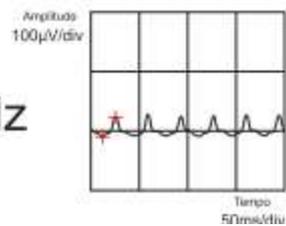
10Hz



15Hz



30Hz



Aplicação de Infiximabe (3 aplicações de Infiximabe)

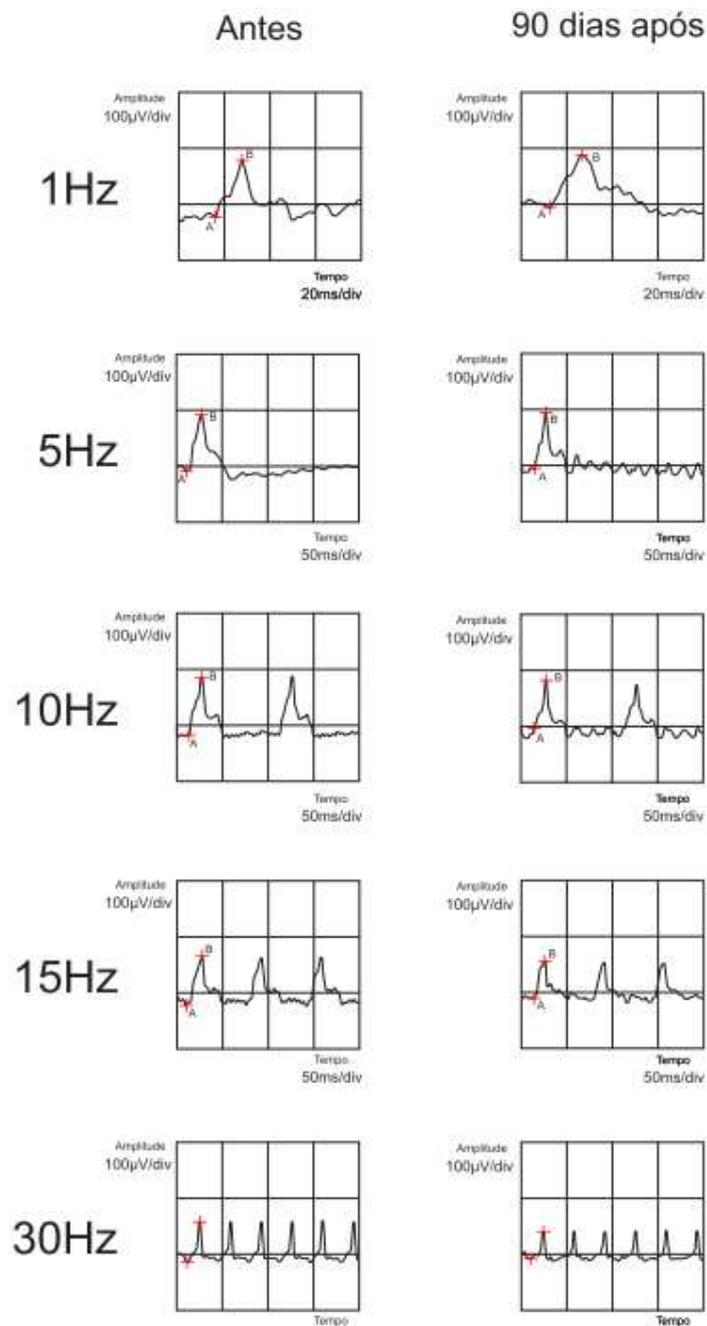


Figura 12 – Exame eletrorretinográfico antes e após injeções de infiximabe e BSS. Ondas a e b após as injeções, com amplitude e latência normais. Não foram encontradas diferenças significativas, tanto na amplitude quanto na latência dessas ondas.

Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

5.1.1 Análise estatística das avaliações eletrorretinográficas

Após análise pelos testes estatísticos, em um único caso observou-se diferença de variâncias na comparação entre os olhos antes da realização das injeções e trinta dias após a última injeção intravítrea, P1 (20 ms) de olho direito. Foi então utilizado alternativamente o teste não paramétrico de postos com sinais de Wilcoxon. Em todas as comparações efetuadas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

5.2 Resultados dos exames anatomopatológicos

Após fixação das peças, como descrita anteriormente, as espécimes anatômicas de todos os coelhos foram examinadas por especialista com experiência em patologia ocular tanto em humanos como em animais. Em nenhum olho foram constatadas alterações nas células da retina sensorial, na camada de células pigmentares e na coroide. Não houve alterações na espessura das camadas da retina e nem sinais de atrofia, edema ou microcistos.

Não foi encontrada em nenhum dos olhos, a presença de descolamento e edema de retina. Não foram percebidas alterações histológicas nas camadas da retina sensorial. A camada do epitélio pigmentar e a da coroide apresentaram-se normais em todos os olhos estudados. Não se constataram sinais de atrofia e edema tanto nas células como na espessura das camadas retinianas e da coroide (figura 13). Houve pequena alteração em alguns olhos submetidos a duas e três aplicações de infliximabe com presença, no vítreo, de raros linfócitos e eosinófilos, sem comprometimento retiniano e sem significado clínico (figura 14). Esta discreta alteração foi encontrada em dois olhos de coelhos submetidos a duas aplicações e em oito olhos de coelhos submetidos a três aplicações. A única alteração clinicamente significativa foi uma reação inflamatória no vítreo com presença de fibrina e sem alterações na camada de células ganglionares e demais camadas da retina e coroide (figura 15) nos dois olhos de um coelho que foi submetido a duas e três aplicações de infliximabe.

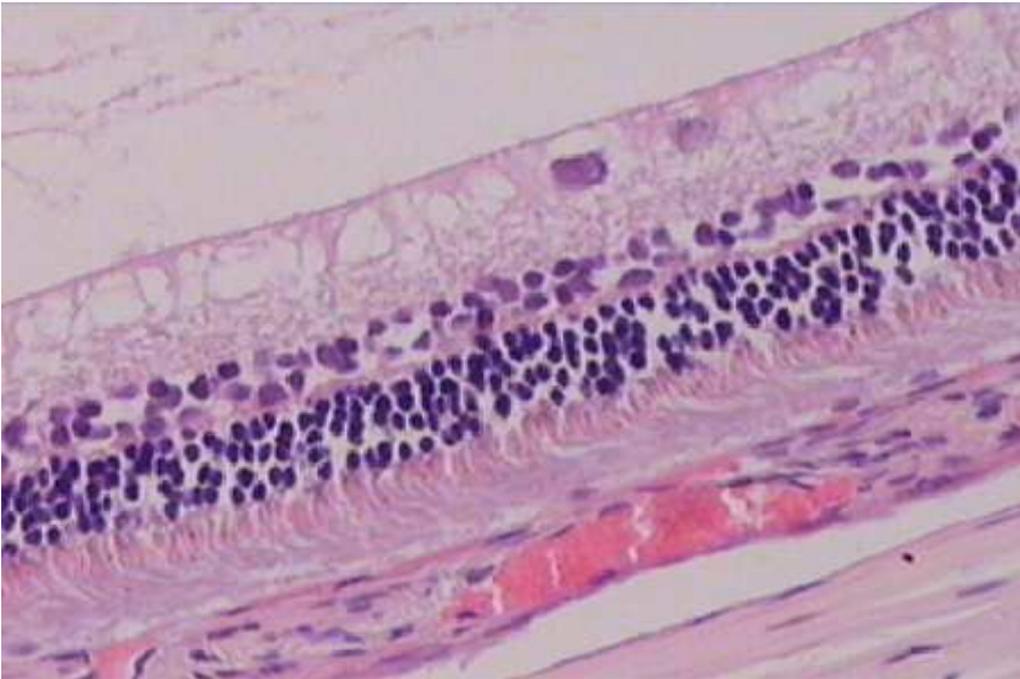


Figura 13 – Olho de coelho albino após três aplicações de infliximabe mostrando citoarquitetura retiniana normal
Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

Linfócito

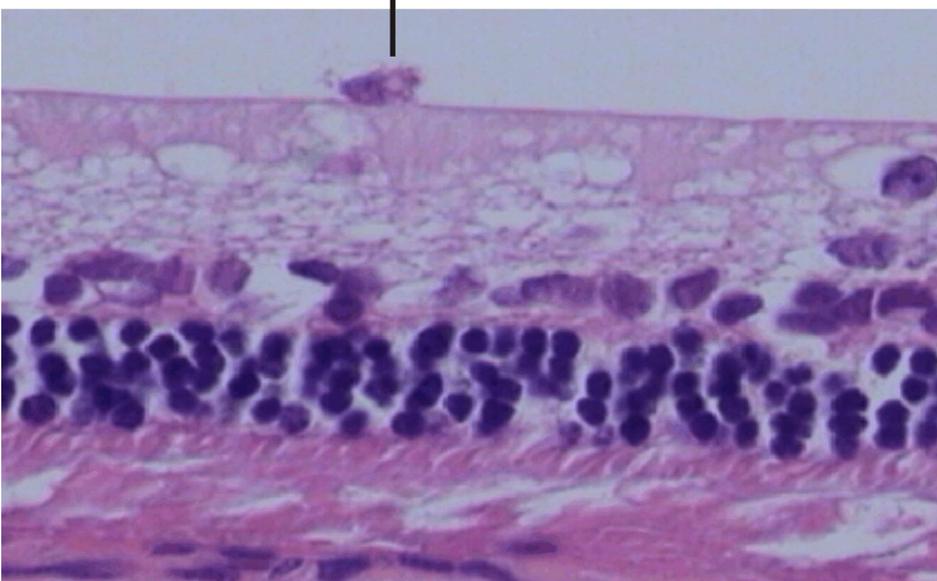


Figura 14 – Presença de um linfócito no vítreo e retina de aspecto normal
Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

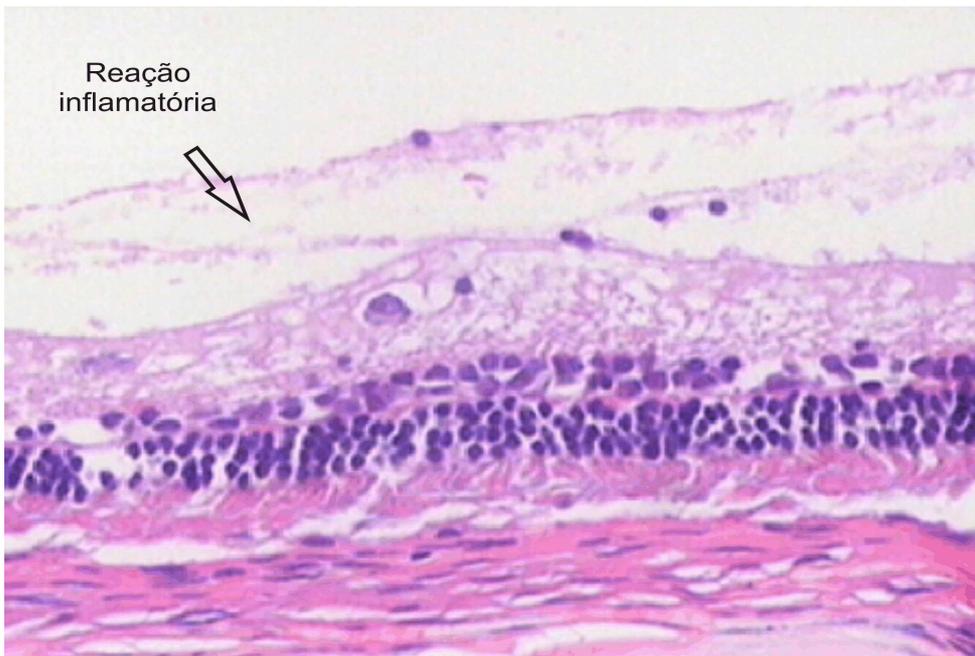


Figura 15 – Presença de reação inflamatória na interface vítreo retiniana
Fonte: Rassi A, arquivo pessoal, 2011

5.2.1 Análise estatística das avaliações histológicas

Como houve alterações nos olhos de um coelho, o teste exato de Fisher mostrou um valor de p de 1,00, ou seja, não houve diferença estatística entre os olhos submetidos à injeção de BSS e duas e três aplicações de infliximabe.

5.3 Resultados dos exames clínicos oftalmológicos

A única alteração encontrada foi a presença, em dois coelhos, de uma discreta opacificação da cápsula posterior do cristalino.

6 DISCUSSÃO

A administração intravítrea de drogas tem sido utilizada com frequência para o tratamento de diversas doenças que acometem a retina, a coroide e o vítreo. Em geral, essa via é segura e com menor incidência de efeitos colaterais sistêmicos, quando comparada à oral ou à endovenosa, pois a administração direta da droga na cavidade vítrea proporciona maior concentração terapêutica e menor biodisponibilidade sistêmica.

Com essa via de acesso, maiores concentrações dos medicamentos são alcançadas, melhorando a sua eficácia e diminuindo a possibilidade de efeitos colaterais sistêmicos, em virtude da baixa dosagem utilizada.

Considerando os sérios efeitos provocados pelo uso de infliximabe endovenoso, a injeção intravítrea, por utilizar uma dosagem bem menor desse agente farmacológico, pode evitar o aparecimento desses efeitos e ser utilizada com maior segurança no tratamento de algumas doenças inflamatórias oculares, desde que haja ausência de toxicidade retiniana. O estudo desse medicamento por via intravítrea, em pacientes portadores de uveítes inflamatórias não infecciosas, degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética, pode fornecer uma nova arma terapêutica de grande valia na tentativa de melhorar a visão e a qualidade de vida desses pacientes.

A finalidade deste estudo foi avaliar a segurança de injeções seriadas intravítreas de infliximabe, analisando a possível toxicidade que ela possa causar, pelo estudo do exame clínico oftalmológico, da eletrofisiologia e da histologia da retina de coelhos. O uso dessa substância por via endovenosa, além do alto custo financeiro, exige alta dosagem para alcançar níveis terapêuticos adequados na retina e os efeitos colaterais, em alguns casos, são relevantes.

Em casos de doenças oculares, uma dosagem bem menor administrada por via intravítrea pode ser uma opção adequada de tratamento desde que não provoque toxicidade à retina sensorial. Além disso, há o fator econômico, já que pequenas doses, caso se mostrem seguras, terão um custo mais acessível.

O estudo piloto realizado com infliximabe em coelhos com uma única injeção intravítrea levou à conclusão, após exames clínicos, fundoscópicos e eletrofisiológicos, de que 2 mg de infliximabe é uma dosagem que não provoca toxicidade ao tecido neurosensorial e

ao epitélio pigmentar da retina (THEODOSSIADIS *et al.*, 2009).

Em outro estudo, também realizado com coelhos albinos da raça New Zealand, em que foram utilizadas diferentes doses de infliximabe intravítreo (1,0 mg, 1,7 mg e 3,3 mg em 0,1 ml), os resultados mostraram que a utilização de dosagens inferiores a 2 mg não provocaram alterações eletrofisiológicas e histológicas e que dosagem de 3,3 mg ou superior mostrou significativo edema das fibras nervosas e células ganglionares. A meia vida da droga foi estimada em 8,5 dias (GIANSANTI *et al.*, 2008).

Outro estudo realizado em ratos mostrou que infliximabe por via intraocular, além de não provocar toxicidade, inibiu o crescimento de neovascularização coroideana, que tinha sido induzida por aplicações prévias de fotocoagulação com raios laser na área peripapilar. Após as aplicações de laser, os olhos foram submetidos a injeção intravítrea, e uma única aplicação de infliximabe demonstrou a capacidade desse medicamento em inibir o aparecimento de neovasos, sem efeitos tóxicos demonstrados (OLSON *et al.*, 2007).

O presente estudo teve por finalidade avaliar se o uso de duas e três aplicações de infliximabe, um anticorpo monoclonal anti-TNF, quando aplicado em olhos de coelhos não provoca, pelos efeitos acumulativos, alterações na fisiologia e na histologia da retina, uma vez que, como ocorre com outras drogas utilizadas por via intravítrea, em geral, são necessárias mais de uma aplicação para alcançar os efeitos terapêuticos desejados.

Os estudos do uso de 2 mg infliximabe intravítreo em coelhos, até o presente momento, utilizando uma única aplicação, mostraram, após exames clínicos, fundoscópicos e eletrofisiológicos resultados convincentes da segurança dessa droga (THEODOSSIADIS *et al.*, 2005; GIANSANTI *et al.*, 2008).

O exame clínico oftalmológico (biomicroscopia, oftalmoscopia binocular indireta e tonometria de aplanção), realizados aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório revelaram somente a presença de pequena opacificação periférica do cristalino em dois coelhos. Devemos mencionar que o cristalino do coelho apresenta um comprimento axial bem maior do que o humano, e eventuais toques com a agulha utilizada na aplicação intravítrea explica a maior incidência de opacificações periféricas no mesmo. Apesar do volume injetado (0,06ml/2mg), não se constatou aumento da pressão intraocular em nenhum dos coelhos.

Este estudo avaliou pela primeira vez na literatura mundial possíveis alterações eletrofisiológicas causadas por duas e três injeções sequenciais de infliximabe na cavidade

vítrea, com período de seguimento de 90 dias. Tais alterações eletrofisiológicas são tidas como padrão ouro na detecção de lesões medicamentosas aos tecidos retinianos. Elas ocorrem em decorrência das modificações na morfologia e na amplitude das ondas captadas. Por não ter ocorrido nenhuma mudança nos traçados na evolução final (90 dias), em comparação aos achados iniciais (antes da primeira injeção), conclui-se que duas ou três injeções de infliximabe na cavidade vítrea não causam efeitos nocivos aos elementos celulares retinianos no longo termo.

O presente estudo avaliou as possíveis alterações histológicas mediante exames realizados ao final do período de observação pós operatório (90 dias) da retina de coelhos, após duas e três aplicações de infliximabe em intervalos mensais. Uma pequena alteração notada no exame histológico foi a presença, no vítreo, de raros linfócitos e eosinófilos em quatro olhos submetidos a duas aplicações e em seis olhos submetidos a três aplicações de infliximabe.

É importante salientar que toda a estrutura da retina sensorial, epitélio pigmentar e coroide não apresentou qualquer alteração, quer na morfologia das células, na espessura dessas camadas ou no exame eletrorretinográfico. Tratam-se de alterações menores, inespecíficas e não foram consideradas como complicações ou secundárias ao uso do medicamento. A hipótese mais provável é que são somente microhemorragias causadas pelo trauma cirúrgico, provocado pelo número de aplicações e não uma reação tóxica ou inflamatória ao uso intravítreo do infliximabe.

A única alteração histológica que chamou a atenção foi encontrada em dois olhos de um coelho em que foram feitas duas e três aplicações de infliximabe. Nesses olhos, notou-se a presença de uma reação inflamatória na interface vítreo retiniana com presença de depósito de material fibrinoide, que pode ou não estar relacionado com o uso do medicamento, embora sem valor estatístico.

Possíveis razões para respostas inflamatórias a injeções intravítreas de infliximabe incluem reação ao anticorpo monoclonal, a proteínas desconhecidas ou a outras contaminações presentes com o uso da droga.

O infliximabe é um anticorpo monoclonal 25% murino e 75% humano, diferente de bevacizumabe e ranibizumabe, que são 5% murinos. Por causa de sua composição murina, ele poderia incitar uma reação imunogênica com produção de anticorpos quando usado por via

endovenosa, sobretudo se a dose inicial for pequena ou não sustentada. É também possível que impurezas protéicas ou contaminações desconhecidas possam ser responsáveis por essa reação inflamatória.

Dados indicam que infliximabe não mostra, em curto prazo, toxicidade para a retina, e mais de duas doses podem ser utilizadas com segurança em estudos clínicos humanos para avaliar o seu possível papel terapêutico em várias patologias retinianas, nas quais o TNF tenha papel destacado.

A primeira experiência com o uso de infliximabe por via intravítrea em pacientes com DMRI foi relatada em um artigo em que Theodosiadis *et al.* (2009) apresentaram um estudo realizado em três pacientes que não obtiveram bons resultados com ranibizumabe e, quando submetidos a duas aplicações intravítreas de infliximabe, houve melhora na acuidade visual e diminuição da espessura foveolar, com utilização de uma dosagem de 2 mg, sem efeitos colaterais. Em um segundo estudo em humanos (GIGANTI *et al.*, 2010) utilizando menor dosagem (0,5 mg) em dois pacientes com retinopatia diabética e edema macular, e dois com DMRI e membrana neovascular, constatou-se piora da acuidade visual e do edema macular com alterações no eletrorretinograma.

Entretanto, duas diferenças devem ser ressaltadas entre os dois estudos: no primeiro (THEODOSSIADIS *et al.*, 2009), os pacientes tinham recebido somente uma dose de ranibizumabe e, no outro (GIGANTI *et al.*, 2010), várias doses de medicamentos antiangiogênicos já tinham sido utilizadas sem sucesso, e dois pacientes já haviam apresentado reações inflamatórias após o uso de triancinolona e bevacizumabe. Outra diferença importante entre os dois estudos consistiu na dosagem mais alta (2 mg *versus* 0,5 mg) usada no primeiro trabalho (THEODOSSIADIS *et al.*, 2009). Sabe-se que quando infliximabe é utilizado por via sistêmica, paradoxalmente, dosagens mais altas têm menor possibilidade de provocar o desenvolvimento de anticorpos humanos antiquméricos (HACAs) (WONG *et al.*, 2008). Porém um trabalho no qual se utilizou dosagem de 1,5 mg de infliximabe, em pacientes portadores de uveíte crônica não infecciosa, não se evidenciou reação inflamatória em nenhum dos olhos examinados e melhora tanto da acuidade visual quanto da espessura da mácula (FARVARDIN *et al.*, 2010).

Um protocolo clínico, financiado por National Eye Institute dos Estados Unidos, está recrutando participantes para determinar se infliximabe ou outras drogas imunossupressoras

podem ser usadas no tratamento de neovascularização da coroide em DMRI.

Salientamos também que o infliximabe, por ser um anticorpo com proteínas humanas e murinas, pode levar a reações inflamatórias com menor frequência em humanos do que em coelhos, já que os dois anticorpos são estranhos a esses animais. Como não houve alterações na morfologia das ondas a e b antes e após as injeções, a função eletrorretinográfica da retina não foi alterada com o uso da droga. Os estudos de todas as lâminas obtidas dos olhos dos coelhos não revelaram a presença de alterações nas diversas camadas da retina, o que corrobora a não toxicidade do uso intraocular de duas e três aplicações de infliximabe.

COMENTÁRIOS FINAIS

Este trabalho realizado em conjunto CEROF/FM/HC/UFG com o grande apoio do biotério central da Universidade Federal de Goiás apresenta um passo inicial de uma nova linha de pesquisa. Conseguiu-se, em curto intervalo de tempo, a implantação de padrões internacionais de pesquisa e abriu novos caminhos para integração da pesquisa de bancada à aplicação clínica dos produtos e resultados. É a mais viva forma do conceito atual de medicina translacional. Pretende-se, tão logo o trabalho seja analisado pela comunidade acadêmica, testar o uso da substância avaliada – o infliximabe – em seres humanos, especificamente naqueles portadores de uveítes não infecciosas, forma exsudativa da degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética.

PONTOS NEGATIVOS

Poder-se-ia utilizar testes imuno-histoquímicos na avaliação pós-operatória dos tecidos coletados. A avaliação eletrofisiológica poderia também ser realizada com sistema multifocal.

Apesar da vasta maioria da literatura existente utilizar a metodologia que foi executada para o objetivo proposto, pretende-se, no futuro, adicionar essas ferramentas à nova linha de pesquisa implantada.

O número de olhos do grupo controle poderia ser mais ampliado. Antes do início do trabalho, o pesquisador e o orientador tiveram reunião com membros que participam do comitê da ARVO nos Estados Unidos da América e houve a clara orientação de diminuir ou mesmo abolir o número de animais-controle utilizados em pesquisas clínicas. Assim optou-se por um número considerado adequado (40%) para comparação intergrupos dos animais utilizados em cada um dos dois grupos de estudo.

7 CONCLUSÃO

Após avaliação dos exames clínicos, clínicos oftalmológicos, eletrorretinográficos e anatomopatológicos de olhos de coelhos albinos submetidos a duas ou três injeções intravítreas seriadas de infliximabe, conclui-se que:

- a) duas ou três aplicações de infliximabe intravítreo na dosagem de 2 mg mostraram-se seguras em coelhos, por não produzirem alterações tóxicas na retina sensorial, epitélio pigmentar e coroide após avaliação clínica, eletrofisiológica e anatomopatológica;
- b) não foram encontradas alterações no exame clínico (biomicroscopia, oftalmoscopia binocular indireta e tonometria de aplanção) em todos os olhos examinados;
- c) não foram encontradas alterações eletrofisiológicas em todos os olhos examinados;
- d) não foram encontradas alterações histológicas na retina sensorial, epitélio pigmentar e coroide em todos os olhos examinados.

8 REFERÊNCIAS

ADAN A, SANMARTI R, BURES A, MARANO RP. Successful treatment with infliximab in a patient with diffuse sub retinal fibrosis syndrome. *Amer Journal Ophthalmology*, v 143, p.533-534. 2007.

AKOBENG AK, ZACHOS M. Tumor necrosis factor alpha antibody for induction of remission in Crohn disease. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003574, 2004.

ANDERSON DH, MULLIN RF, HAGEMAN GS, *et al.* A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol*, v. 134, p 411-31. 2002.

ARMSTRONG D, AUGUSTIN AJ, SPENGLER R, *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*, v. 212, p. 410-414. 1998.

BALTATZIS S, TUFAIL F, YU EN, *et al.* Mycophenolate mofetil as an immunomodulatory agent in the treatment of chronic ocular inflammatory disorders. *Ophthalmology*, v. 110, p. 1061-5. 2003.

BARONDES M, PAULEIKHOFF D, CHISHOLM IC, *et al.* Bilaterality of drusen *Br J. Ophthalmol*, v. 74, p. 180-82. 1990.

BAROUCH FC, MIYAMOTO K, ALLPORT JR, *et al.* Integrant-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, v. 41, p. 1153-1158. 2000.

BAZZONI F, BEUTLER B. The tumor necrosis factor alfa and receptor families. *N Engl J Med*, v. 334, p. 1717-1724. 1966.

BENNETT MD, YEE W. Pegaptanib for myopic choroidal neovascularization in a young patient. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, v. 245 p. 903-905. 2007.

BIRD AC, BRESSLER NM, BRESSLER SB, *et al.* An international classification and grading system of age-related maculopathy an age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*, v. 39 p. 367-374. 1995.

BIRD AC. The Bowman Lecture. Towards an understanding of age-related macular disease. *Eye*, v. 17, p. 457-466. 2003.

BODAGHI B, BUIQUOQ E, WECHSLER B, *et al.* Therapeutic use of Infliximab in sight-threatening uveitis: retrospective analysis of efficacy, safety and limiting factors. *Ann Rheum Disease*, v. 64, p. 962-64. 2005.

BRAUN J, BARALIADOS X, LISTING J, *et al.* Decreased incidence of anterior uveitis in

patients with ankylosing spondylitis treated with the anti-TNF agents infliximab and etanercept. *Arthritis Rheum*, v. 52, p. 241-247. 2005.

BROWN SL, GREENE MH, GERSSNHON SK, *et al.* Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum*, v. 46, p. 3151-3158. 2002.

CANETE JD, PABLOS JL, SANMARTI R, *et al.* Antiangiogenic effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 50, p. 1636-1641. 2004.

CHARLES PJ, SMEENK RG, DE JONG J, *et al.* Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to TNF alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. *Arthritis Rheum*, v. 43, p. 2383-2389. 2000.

CHEN YF, JOBANPUTRA P, BARTON P, *et al.* A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness. *Health Technol Assess* v.10, p. 1-229. 2006

CHRONOPOULOU H, TZAVAA V, OIKONOMOPOULOS N, *et al.* High levels of TNF-alpha in the aqueous humor in patients suffering from Adamantiades-Behçet disease: preliminary results. *Invest Ophthalmol VisSci*, v. 42, p. 42-48. 2001.

CLEGG DO. Treatment of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol Suppl*, v. 78, p. 24-31. 2006.

CRAIGIE HE. Practical anatomy of the rabbit. The Blackiston Company, p.92-94. 1948

DAVIS FA. The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc* v. 27, p. 401-441. 1929.

DASTGHEIB K, GREEN WR. Granulomatous reaction to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, v. 112, p. 813-8. 1994.

DIAMANTI A, CASTRO M, PAPADATOU B, *et al.* Severe anaphylactic reaction to infliximab in pediatric patients with Crohn's disease. *J Pediatric*, v. 140, p. 636-7. 2002.

DICK AD, FORREST JV, LIVERSIDGE J, *et al.* The role of tumor necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Prog Retin Eye Res*, v.23, p. 617-637. 2004.

DOUNI E, SFIKAKIS PP, FERNANDEZ P, *et al.* Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols. *Arthritis Res Therapy*, v. 6, p. 65-72. 2004.

EDWARDS IR, ARONSON JK. Adverse drug reactions: definition, diagnosis, and

management. *Lancet*, v. 356, p. 1255-1259. 2000.

ELLERIN T, RUBIN RH, WEINBLATT ME, *et al.* Infections and anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum*, v. 48, p. 3013-3021. 2003.

EL-SHABRAWI Y, HERMANN J. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy with infliximab as an alternative to corticosteroids in the treatment of human leukocyte antigen B27 associated acute anterior uveitis. *Ophthalmology*, v. 109, p. 2342-2346. 2002.

FARVARDIN M, AFARID M, MEHRYAR M, *et al.* Intravitreal infliximab for the treatment of sight-threatening chronic noninfectious uveites. *Retina*, v. 30, p. 1530-1535. 2010.

FELDMAN M, MAINI RN. Anti-TNF- a therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*, v. 19, p. 163-196. 2001.

FISHMAN GA, CARRASCO C, FISHMAN M. The electrooculogram in diffuse (familial) drusen. *Arch Ophthalmol*, v. 94, p. 231-33. 1976.

FISHMAN GA, BIRCH DG, HOLDER GE, *et al.* Electrophysiologic testing in disorders of the retina, optic nerve, and visual pathway. 2nd ed. San Francisco, CA: The Foundation of the American Academy of Ophthalmology; p.1-141. 2000.

FLEISHER LN, FERRELLJB, MCGAHAN MC. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor an endotoxin. *Inflammation*, v.14, p. 325-335. 1990.

FOROOZAN R, BUONO LM, SERGOTT RC, *et al.* Retro bulbar optic neuritis associated with infliximab. *Arch Ophthalmology*, v. 120, p. 985-987. 2002.

FORRESTER JV, DUKE ELDER. Lecture: New concepts on the role of autoimmunity in the pathogenesis of uveitis. *Eye*, v. 6, p. 433-446. 1992.

FOSTER C S, TUFAIL F, WAHEED NK, *et al.* Efficacy of etanercept in preventing relapse of uveitis controlled by methotrexate. *Arch Ophthalmol*, v.121, p. 431-40. 2003.

FRANKS LM, TEICH N. *Introdução à biologia celular e molecular do câncer*. São Paulo .Roca 1990.

FRISHMAN LJ, HECKENLIVELY JR, ARDEN GB, *et al.* *Principles and Praticce of Clinical Electrophysiology of Vision*. 2nd ed., Massachusetts Institute of Technology, p. 139-183. 2006.

GALOR A, PERES V L, HAMMEL J P. Differential Effectiveness of Etanercept and Infliximab in the Treatment of Ocular Inflammation. *Am J of Ophthalmol*, v.113, p. 2317-2323. 2006.

GARRITY JA, COLEMAN AW, MATTESON EL, *et al.* Treatment of recalcitrant idiopathic orbital inflammation (Chronic orbital myositis) with infliximab *Am J Ophthalmol*, v.138, p. 925-930. 2004.

GASS, JD. *Stereoscopic Atlas of Macular Disease: Diagnosis and Management* St Louis , Mosby ed. 4, p. 24-6 and 82-7. 1997.

GIANSANTI F, RAMZZOTTI M, VANNOZZI L, *et al.* A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. *Investigative Ophthalmology & visual science*, v. 49, p. 1151-1156. , 2008.

GIGANTI M, BEER PM, LEMANSKI N, *et al.* Adverse events after intravitreal infliximab (remicade). *Retina*, v. 30, p. 71-80. 2010.

GOLDSTEIN DA, FONTAMILLA FA, KAUL S, *et al.* Long-term follow-up of patients treated with short-term high-dose chlorambucil for sight-threatening ocular inflammation. *Ophthalmology*, v. 109, p. 370-7. 2002.

GONZALEZ-CLEMENTE JM, MAURICIO D, RICHARD C, *et al.* Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF-alpha system in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* , v. 63, p. 525-529. 2005.

GREEN WR, MCDONNELL PJ, YEO HH. Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmology*, v. 92, p. 615-27. 1985.

HARAOUI B, CAMERON L. OUELLET M, *et al.* Anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response. *J Rheumatol*, v.33, p. 31-36. 2006.

HUTCHINSON AK, GROSSNIKLAUS HE, CAPONE A. Giant-cell reaction in surgically excised sub retinal neovascular membrane. *Arch Ophthalmol*, v. 111, p. 734-5. 1993.

HYRICH KIL, SILMAN AJ, WATSON KD, SYMMONS DPM. Anti tumor necrosis factor alfa therapy in rheumatoid arthritis: an update on safety. *Ann Rheum Dis*, v. 63, p. 1538-1543. 2004.

JACOBI A, *et al.* Role of TNF-alfa in inflammatory process. *JEAV* v. 20, p. 1171-1187. 2006.

JANEWAY CA, *et al.* (eds). *Immunobiology. The immune system in health and disease*, 4th edition, New York, Garland, 1999.

JOSEPH A, RAJ D, DUA HS, *et al.* Infliximab in the treatment of refractory posterior uveitis. *Ophthalmolgy*, v. 110, p. 1449-1453. 2003.

JOUSSEN A, DOEHMEN S, LE MINH L, *et al.* TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long term histopathological alterations. *Molecular vision*, v. 150, p. 1418-28. 2009.

JOUSSEN AM, MURATA T, TSUJIKAWA A, *et al.* Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J pathol*, v. 158, p. 147-152. 2001.

JOUSSEN AM, POULAKI V, LE ML, *et al.* A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J*, v. 18, p. 1450-1452. 2004.

JOUSSEN AM, POULAKI V, MITSIADES N, *et al.* Non steroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *FASEB J*, v. 16, p. 3348-440. 2002.

JOUSSEN AM, POULAKI V, QUIN W, *et al.* Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *Am J Pathol*, v. 160, p. 501-509. 2002.

KAHN P, WEISS M, IMUNDO LF, *et al.* Favorable Response to High-Dose Infliximab for Refractory Childhood Uveitis. *American Academy of Ophthalmology Published by Elsevier Inc*, v. 113, p. 860-864. 2006.

KEANE J, GERSHON S, WISE RP, *et al.* Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor a-neutralizing agent, *N Engl J Med*, v. 345, p. 1098-1104. 1999.

KEFFER J, PROBERT L, CAZLARIS H., *et al.* Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model or arthritis. *EMBO J*, c. 10, p. 4025-4031. 1991.

KILLINGSWORTH MC, SARCS JP, SARCS SH. Macrophages related to Bruchs membrane in age related macular degeneration *Eye*, v. 4, p. 613-21. 1990.

KILMARTIN DJ, FORRESTER JV, DICK AD. Cyclosporine A therapy in refractory non-infectious childhood uveitis. *Br J Ophthalmol*, v. 82, p. 737-42. 1998.

KNIGHT DM, TRINH H, SIEGEL S, *et al.* Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol*. V.30, p.1443-1453. 1993.

KOHLER G. MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, p. 256-495. 1975.

KONSTANTINIS L, MATEL I, POURNARA JÁ, *et al.* Intravitreal ranibizumab (Lucentis) for the treatment of myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* v.247, p. 311-318. 2009.

LACOMB MS, MARTIN CM, GALLARDO CALERA G.M, *et al.* Aqueous humor and serum tumor necrosis factor – an in clinical uveitis. *Ophthalmic Res*, c. 33, p. 251-255. 2001.

LASAVE AF, DIAS LM, MUCCIOLI C, *et al.* Intravitreal clindamycin and dexamethazone for zone 1 toxoplasmic retinochoroiditis at twenty four months *Ophthalmology*, v. 117, p. 1831-8. 2010.

LEI WAN, HUI-JU LIN, YUSHIN TSAI, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Retina*, c.30, p. 1595-1600.2010.

LEWIS JD. Anti-TNF antibodies for Crohn's disease-in pursuit of the perfect clinical trial. *N Engl J Med*, v. 357, p. 296-298. 2007.

LIMB GA, CHIGNELL AH, GREEN W, *et al.* Distribution of TNF alpha and its reactive vascular adhesion molecules in fibro vascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol*, c. 80, p. 168-173. 1996.

LIMB GA, SOOMRO H, JANIKOUN S, *et al.* Evidence of control of tumor necrosis factor – alpha (TNF-alpha) activity by TNF receptors in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Clin. Exp. Immunol*, c. 115, p. 409-414. 1999.

LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LEONARDO MJ. The TNF and TNF receptor super families: integrating mammalian biology. *Cell*, v. 104, p. 487-501. 2001.

MAIM R, ST CLAIR EWW, BREEDVED F, *et al.* Infliximab (chimeric anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*, c. 354, p. 1932-1939. 2000.

MAJKA S, MCGUIRE PG, Das A. Regulation of matrix metalloproteinase expression by tumor necrosis factor in a murine model of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vist Sci*, c. 43, p. 260-266. 2002.

MARKOMICHELAKIS NN, THEODOSSIADIS PG, PANTELIA E, *et al.* Infliximab for Chronic cystoid macular edema associated with uveitis *Am J Ophthalmol*, v. 138, p. 648-650. 2004.

MARKLOMICHELAKIS NN, THEODOSSIADIS PG, SFIKAKIS PP. Regression of neovascular age-related macular degeneration following infliximab therapy. *Am J Ophthalmol*, v. 139, p. 537-540. 2005.

MICHALANY J. Técnica histológica em Anatomia Patológica. São Paulo, Ed.Pedagogica e Universitária, 1981.

MOHAN N, EDWARDS ET, CUPPS TR, *et al.* Demyelization occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 44, p. 2864-2869. 2001.

MUNOZ-FERNANDEZ S, HIDALCO V, FERNANDEZ MJ, *et al.* Effect of infliximab on threatening panuveitis in Behcet disease (letter) *Lancet*, v. 358, p. 1644. 2001.

NAKAMURA S, YAMAKAWA T, SUGITA M, *et al.* The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sciv.* 31, p. 3884-3889. 1994.

NUSSENBLATT R.B. Treating intra ocular inflammatory disease in the 21 st century. Arch Ophthalmol, v. 123, p. 1000-1001. 2005.

NUSSENBLATT RB, FERRIS FLLL. Age-related macular degeneration and the immune response: implications for therapy. Am.J Ophthalmol, v. 144, p. 618-626. 2007.

OH H, TAKAGI H, TAKAGI C, *et al.* The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci ;,v. 40, p. 1891-8. 1999.

OKADA AA, SAKAI J, USUI M, MIZUGUCHI. J. Intra ocular Cytokine quantification of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Ocul Immunol Inflamm, v. 6, p. 111-120. 1998.

OLSON JL, COURTNEY JR, MANDAVA N. Intravitreal infliximab and choroidal neovascularization in an animal model Archives of Ophthalmol, v. 125, p. 1221-1224. 2007.

PALEXAS GN, SUSSMAN G, WELSH NH. Ocular and systemic determination of IL-1 beta and tumor necrosis factor in a patient with ocular inflammation. Scand J Immunol;supl, v. 11, p. 173-175. 1992.

PEREIRA JM, *et al.* Estudo normativo do eletrorretinograma de campo total em adultos jovens. Arq. Bras. Oftalmol., vol. 66, no.2, 2003.

RAJARAMAN RT, KIMURA Y, LIS, *et al.* Retrospective case review of pediatric patients with uveitis treated with infliximab . Ophthalmology, v. 45, p. 982-989. 2006.

RAMRATTAN RS, VAN DER SCHAFT TL, MOOY CM, *et al.* Morph metric analysis of Bruchs membrane, the chorocapillaris and the choroid in aging. Invest Ophthalmol VIs Sci, v. 35, p. 2857-64. 2004.

REIFF A, TAKEI S, SADEG S, *et al.* Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. Arthritis Rheum, v. 44, p. 1411-5. 2001.

RICHARDS J C, TAY KEARNEY ML, MURRAY K, *et al.* Infliximab for juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. Clin Exp Ophthalmol, v. 33, p. 461-468. 2005.

RISPO A, SCARPA R, DI GIROLAMO E, *et al.* Infliximab in the treatment of extra-intestinal manifestations of Crohn s disease. Scand J Rheumato, v. 34, p. 387-391. 2005.

RODRIGUES EB, FARAH ME, MAIA M, *et al.* Therapeutic monoclonal antibody in ophthalmology. Prog Retin Eye Res, v. 28, p.117-144. 2009.

MARKOMICHELAKIS NN, THEODOSSIADIS PG, PANTELIA E, *et al.* Infliximab for Chronic cystoid macular edema associated with uveitis Am J Ophthamo, v. 138, p. 648-650. 2004.

ROSENBAUM J.T. Treatment of severe refractory uveitis with intravenous cyclophosphamide. *J Rheumatol*, v. 21, p. 123-5. 1994.

ROSENBAUM JT, HOWES EL, RUBIN RM, SAMPLES JR. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor AM. *J Pathol*, v. 133, p. 47-53. 1988.

ROSENBAUM JT, SMITH JR. Anti-TNF Therapy for eye involvement in spondyloarthropathy. *Clin Exp Rheumatol*, v. 20, p. 143-145. 2002.

SACAI PY *et al.* Contribuição diagnóstica da avaliação eletrofisiológica visual em pacientes atendidos em hospital universitário. *Arq. Bras. Oftalmol*, v. 66, 2003 .

SCALLON B. MOORE M.A, TRINH H, *et al.* Chimeric anti-TNF- α monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF- α and activates immune effector functions *Cytokine*. V.7 p. 251-259. 1995.

SFIKAKIS PP, THEODOSSIADIS PG, KATSIARI CG, *et al.* Effect of infliximab on sight-threatening panuveitis in Behcet disease. *Lancet*, v. 358, p. 295-296. 2001.

SFIKAKIS PP., KOLLIAS G. TNF biology in experimental a clinical arthritis. *Curr Opin Rheumatolo*, v. 15, p. 380-386. 2003

SFIKAKIS PP, KAKLAMANIS P, ELEZOGLOU A, *et al.* Infliximab for recurrent sight-threatening ocular inflammation in Adamantiades-Behçet disease. *Ann Intern Med*, v. 140, p. 404-406. 2004.

SFIKAKIS PP, MARKOMICHELAKIS N, THEODOSSIADIS GP, *et al.* Regression of sight-threatening macular edema in type 2 diabetes following treatment with the anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody infliximab. *Diabetes Care*, v. 28, p. 445-447. 2005..

SILVA RM, RUIZ-MORENO JM, NASCIMENTO J, *et al.* Short-term efficacy and safety of intravitreal ranibizumab for myopic choroidal neovascularization . *Retina*, v. 28, p. 117-1123. 2009.

SHI X, SEMKIVA I, MÜTHER OS, *et al.* Inhibition of TNF-alpha reduces laser2006-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*, v. 83, p. 1325-1334. 2006.

SLIFMAN NR, GERSHON SK, LEE JH, *et al.* *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor a-neutralizing agents. *Arthritis Rheum*, v. 48, p. 319- 324. 2003.

SMITH KJ, STELTON HG. Rapid onset of cutaneous squamous cell carcinoma in patients with rheumatoid arthritis after starting tumor necrosis factor alpha receptor gG1-Fc fusion complex therapy. *J Am Acad Dermatology*, v. 45, p. 953-956. 2001.

SMITH RS, JOHN SW, NISHINA PN, *et al.* Systematic evaluation of the mouse eye - Anatomy, Pathology and Biometrics: CRC Press v.1, p. 195-225. 2000.

STEIN R, HANAUER S. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf*, v. 23, p. 429-48. 2000.

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. *Rheumatology Int*, v. 26, p. 252-256. 2006.

THEODOSSIADIS PG, LIARAKOS VS, SFIKAKIS PP, *et al*. Intravitreal administration of the anti-TNF monoclonal antibody infliximab in the rabbit. *Graeffes Arch Ophthalmology*, v. 247, p. 273-281. 2009.

THEODOSSIADIS PG, LIARAKOS VS, SFIKAKIS PS, *et al*. Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration. *American J Ophthalmol*, v. 147, p. 825-830. 2009.

THEODOSSIADIS PG, MARKOMICHELAKIS NN, SFIKAKIS PP. Preliminary evidence for an emerging approach in the treatment of ocular inflammation. *Retina*, v. 27, p. 399-413. 2007.

TREVOR TH, HARALD K, THOMAS S, *et al*. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery* v. 9, p. 325-338. 2010.

VIA CS, SHUSTOV A, RUS V, *et al*. In vivo neutralization of TNF-alpha promotes humoral autoimmunity by preventing the induction of CTL. *J Immunol*, v. 167, p. 6821-6826. 2001.

VEDULA SS, KRYSYSTOLIK MG. Antiangiogenic therapy with anti-vascular endothelial growth factor modalities for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*, v. CDO05139. 2008.

WONG CK, HO AW, TONG PC, *et al*. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Clin Exp Immunol*, v. 149, p. 123-131. 2007.

WONG M, ZIRING D, DESAI S, *et al*. TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol*, v. 126, p. 121-136. 2008.

WU TT, KABAT EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* v. 132, p. 211-250. 1970.

YANG P, MCKAY BS, ALLEN JB, *et al*. Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis in human RPE cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 45, p. 2438-2446. 2004.

YANG P, WISER JL, PEAIRS J.J, *et al*. Human RPE expression of cell survival factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 46, p. 1755-1764. 2005.

YOEUM D, Effective use of TNF antagonist. *Arthritis Res Ther*, v. 6, p. 24-30. 2004.

ZAYIT- SOUDRY S, MOROZ I, LOEWENSTEIN A. Retinal pigment epithelial detachment, *Survey of ophthalmology*, v. 52, p. 227-243. 2007.

9 ANEXOS

A safety study of serial intravitreal injections of infliximab in the rabbit.

Leticia D. Alves^{1,2}, M.D.; Alan R. Rassi¹, M.D.; Moacyr Rigueiro³, Ph.D.; Murilo B. Abud¹, M.D.; Ericka C. Freitas¹, M.Sc.; Luciana B. Carneiro¹, Ph.D.; David C. Isaac¹, Ph.D.; Marco P. Avila¹, Ph.D.;

1. Department Of Ophthalmology, Federal University of Goiás, UFG, Goiânia, Goiás, Brazil; 2. Johns Blinn Eye Institute, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA; 3. Pathology, Federal University of São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brazil

Introduction

Infliximab is a human-mouse chimeric IgG antibody, when administered systemically, inhibits the active soluble tumor necrosis factor alpha (TNF- α), the latter implicated in various immune-mediated ocular diseases and angiogenesis in the eye through its pro-inflammatory properties. The intravitreal administration of infliximab, in contrast to systemic administration, could decrease systemic adverse side-effects, such as opportunistic intracellular infection, infusion reaction, neutropenia, thrombocytopenia, and increased malignancy risk, and improve the safety and efficacy of the drug in selected patients. Prior studies investigating potential retinotoxicity effects after single administrations of infliximab have shown that a 2.0 mg dose is non-toxic to the retina. However, there have been no studies to date that have investigated the potential toxicity after serial intravitreal injections of infliximab. Investigating this question was the main focus of this study.

Results

ERG changes were considered non-significant in prior studies if the follow-up difference in amplitude was within 30% of the pre-injection amplitude value. In general, ERG amplitude variations on the order of 10-15% are considered normal variability. In this study, ERG amplitudes were on average 12-13% lower than those obtained prior to treatment at all temporal frequencies. However, there were no statistically significant differences comparing amplitude or implicit time between the pre- and post-treatment ERGs.

Purpose

To evaluate the potential for retinal toxicity of serial intravitreal injections of 2.0mg infliximab in a rabbit model to simulate the serial administration of this drug in a clinical setting.

Methods

Animals

Twelve New Zealand albino rabbits were selected for this study. Each rabbit eye received either two serial injections (n=10) or three injections (n=10), each administration separated by 30 days. A separate group of rabbits eye (n=4) given buffered saline solution (BSS) served as control. The animals were treated according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Intravitreal Injection

Intravitreal injections of 2.0 mg infliximab (Remicade, Schering-Plugh), given on each occasion, was reconstituted with sterile saline solution. In all cases, the injection volume was 0.1 mL. Intravitreal injection in the rabbit eye was made approximately 2 mm posterior to the limbus with a 30-gauge needle attached to a tuberculin syringe.

Clinical Examination

Slit lamp examination and indirect ophthalmoscopy were used to evaluate changes in cornea, lens, vitreous, retina, and optic nerve. Such observations were performed on all eyes immediately after the injections.

Electroretinography

The eyes were evaluated by ERG before injection (baseline) and 90 days after injection. Pupils were dilated and standard ERGs were recorded from both eyes using corneal electrodes (Unipolar Gold ERG jet). Reference and ground electrodes were made of stainless steel surgical needles and were inserted into the tongue and ear respectively. ERG signals were recorded using Roland Consult Q450 (Roland Consult, German). The ERG was restricted to the study of cone function using 1-, 5-, 10-, 15-, and 30- Hz bright flashes on a rod saturating background. Peak amplitude and implicit times of the major components of the ERG were extracted using conventional methods. ERGs were recorded simultaneously from both eyes.

Statistical Analysis

Electrophysiology. To evaluate the statistical differences between the ERGs before the intravitreal injection (baseline) and after 90 days on each eye, first we performed the variance homogeneity test (F-test of variance homogeneity) and, when we did not find any differences in variance, we utilized the paired T-test. We had differences in variance in a single case and, in this case, it was alternatively utilized the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. Histology. Statistical study of the alterations anatomopathological. It was utilized the Fisher exact test.

Histologic Examination

Rabbits were euthanized with a injection of 10% chloral potassium 90 days after injection. The eyes were immediately enucleated, and fixed in a solution of 10% formalin. Eyes were sectioned, and the tissues were processed, embedded in paraffin, sectioned at a thickness of 5 μ m, and stained with hematoxylin-eosin. Histologic examination was performed with light microscopy.

Histologic Findings

There were no differences in histologic appearance between the eyes injected with infliximab and those injected with sterile saline solution. However, in one treated eye, we found more extensive signs of inflammatory activity in the vitreous than in the control eyes. Nevertheless, no pathologic changes were observed in the outer retinal layers or the retinal pigment epithelium.

Conclusion

Intravitreal injections of infliximab are likely to be administered serially in patient populations to control the adverse effects of a number of disease entities. Unlike prior studies that have investigated potential retinotoxicity effects after single administrations, this study investigated the possibility of retinotoxicity after multiple injections at dosages previously found to be relatively safe. We extend these findings by demonstrating the safety of infliximab over multiple injections.

Acknowledgement

We thank Dr. Steven Nusinowitz and Leonardo Bretones for the editorial assistance, as well as Rafael Cinoto, for the statistical analysis.

This study was approved by the Research Committee of Federal University of Goiás.

UFG

PROTÓCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 093/09

Goiânia, 16/09/2009

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL: Alan Ricardo RossiTÍTULO: "Estudo Das Alterações Retinianas Em Coelhos Após Injeção Intrá Vitrea De Infliximab."Área Temática: Grupo IIILocal de realização: Hospitais das Clínicas - CERON

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, analisou e aprovou o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Todas as exigências deste CEPMHA foram devidamente atendidas.

Informamos que não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios semestrais de andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudos em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*).


Farn. José Mário Córdão Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

Cópia da aprovação pelo Comitê de Ética de Pesquisa Médica do Hospital das Clínicas UFG

[ABO] Decisão editorial

Sistema SciELO de Publicação (suporte.aplicacao@scielo.org) [Adicionar contato](#)

Para: professor Alan Ricardo rassi;

Cc: Moacyr Pezati Rigueiro; Leticia Dourado; Â%oricka Campos Freitas; Luciana Barbosa Carneiro; Marcos Pereira Avila;

professor Alan Ricardo rassi,

Foi tomada uma decisão sobre o artigo submetido à revista Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, "estudo das alterações retinianas em olhos de coelhos após injeções intravítreas seriadas de infliximabe".

A decisão é: Artigo aceito para publicação

Prof. Michel Eid Farah
Unifesp
Fone 5511 50551177
Fax 5511 50559557
mefarah@uol.com.br
Michel Eid Farah

Editoria Científica
Arquivos Brasileiros de Oftalmologia

Cópia da aprovação de publicação do trabalho nos Arquivos Brasileiros de Oftalmologia