

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA RETINA DE COELHOS APÓS A INJEÇÃO INTRAVÍTREA DE INFLIXIMAB.

Jorge Agi¹, Marcos Pereira de Ávila², Alan Ricardo Rassi³, Moacyr Pezati Rigueiro⁴, David

Leonardo Cruvinel Isaac⁵, Éricka Campos Freitas⁶

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás (FM-UFG)

Endereço eletrônico: jorge_agi144@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: infliximab; injeção intravítrea; histopatológico

INTRODUÇÃO

Dentre as inúmeras citocinas responsáveis pelo processo inflamatório, o fator de necrose tumoral alfa (FNTA) é uma citocina multifuncional liberada pelos monócitos, macrófagos, linfócitos T em resposta à infecção ou injúria imunológica. Este fator promove inflamação por citotoxicidade direta, bem como por vários mecanismos indiretos, incluindo a regulação da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, mediadores do ácido araquidônico, liberação de espécies de oxigênio e nitrogênio reativos, adesão molecular e fatores angiogênicos (LOCKSLEY, 2001).

O FNTA está envolvido em um amplo espectro de doenças inflamatórias e sua inibição farmacológica tem provado ser de grande valor terapêutico na artrite reumatóide (MAIM, 2000), doença de Crohn (LEWIS, 2007) e doença de Behçet.

Infliximab (Remicade: Roche®, Mannheim, Germany) é uma imunoglobulina quimérica (IgG1 anticorpo humano-rato) que quando administrada sistemicamente inibe o ativo solúvel do FNTA.

Como infliximab contém 30% de proteína de camundongo, ela é imunogênica, podendo, portanto, induzir a formação de anticorpos humanos anti-quiméricos (STEIN, 2000). Dependendo do método utilizado para análise, estes anticorpos têm sido detectados em 15-

- revisado pelo orientador -

¹ Orientando

² Prof^o Titular do Departamento de Oftalmologia – CEROF/UFG e Orientador

³ Prof^o Adjunto do Departamento de Oftalmologia – CEROF/UFG

⁴ Prof^o Adjunto do Departamento de Patologia – UNIFESP

⁵ Prof^o Adjunto do Departamento de Oftalmologia – CEROF/UFG

⁶ Médica Assistente do Setor de Eletrofisiologia – CEROF/UFG

40% dos pacientes tratados com esta droga. Altos títulos destes anticorpos têm sido associados com perda de eficácia e reações de hipersensibilidade semelhantes à doença do soro. (DIAMANTI, 2002).

Além destes parafeitos associados a terapia sistêmica, outros tem sido descritos tais como doenças auto-imunes (MOHAN, 2001), doenças desmielinizantes, propensão para infecções, como tuberculose (ELLERIN, 2003), e aumento de risco de malignidade (SMITH, 2001).

Dessa forma, considerando os graves efeitos colaterais do uso sistêmico de infliximab, que limitam a ampliação de sua utilização, a injeção intravítrea pode ser benéfica no tratamento, em pacientes selecionados, por diminuir a possibilidade destes efeitos devido à baixa dosagem utilizada.

A finalidade deste estudo foi avaliar a segurança da injeção intravítrea de infliximab, através da análise dos achados histopatológicos da retina de coelhos pós-aplicação da droga.

1. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo principal a avaliação dos efeitos da injeção intravítrea de infliximab, através dos achados histopatológicos no epitélio pigmentar e na camada sensorial da retina dos coelhos em estudo após a injeção da droga.

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados 12 coelhos albinos, da raça New Zealand, com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Humanas e Animais da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram tratados de acordo com normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e supervisionados por veterinário (Dra. Ekaterina Akmovna Botovchenco Rivera CRMV 0406).

. Os animais foram divididos em quatro grupos para o estudo. Grupo I: dois olhos foram submetidos a duas aplicações de solução salina balanceada (BSS); Grupo II: dois olhos foram submetidos a três aplicações de BSS, Grupo III: dez olhos foram submetidos a duas aplicações de infliximab e Grupo IV: dez olhos a três aplicações de infliximab. O Infliximab (Remicade 100 mgtm) foi reconstituído com 3 ml de solução salina, tendo sido injetado em cada olho 0,06 ml da solução (2 mg de infliximab).

Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina (Rompum®) e ketamina (Ketalar®) por via intramuscular e submetidos a exame oftalmológico e eletrorretinográfico.

As injeções intravítreas foram feitas a dois milímetros do limbo supero temporal, por médicos oftalmologistas. Os olhos foram dilatados com fenilefrina e cicloplégico, sendo utilizado Moxifloxacino colírio no pré e pós-operatório.

Os coelhos foram submetidos mensalmente a injeções intravítreas sob anestesia e noventa dias após, a novo exame oftalmológico e eletrorretinográfico.

A eutanásia foi feita administrando cloreto de potássio a 10%. Os olhos foram enucleados e fixados em solução de formol a 10%, etanol a 70% por mais de 24 horas e, submetidos a cortes com navalha, retirando-se fatia de aproximadamente 3 mm de espessura, desde a córnea até o nervo óptico. Estas fatias foram incluídas em parafina e realizados cortes em micrótomos na espessura de 5 micrômetros. Os cortes foram corados pela técnica hematoxilina-eosina. A análise foi realizada em microscópio óptico Olympus® e as lâminas foram fotografadas com câmera digital.

3. RESULTADOS

Os olhos não apresentaram opacificações corneanas e aumento da pressão intra-ocular. Notou-se presença de pequena opacificação de cristalino periférico em dois olhos, provocadas pelas injeções intravítreas. Os exames com oftalmoscópio binocular indireto não constataram descolamento de retina, alterações retinianas e no nervo óptico ou presença de opacificações e sinais inflamatórios no vítreo.

Ao exame histopatológico não foram encontrados descolamento e edema de retina e nem percebidas alterações histológicas na retina sensorial, epitélio pigmentar e coróide em todos os olhos estudados. Não se constataram sinais de atrofia e edema tanto nas células como na espessura das camadas retinianas e da coróide (figura 1). Uma pequena alteração encontrada em alguns olhos submetidos a duas e três aplicações de infliximabe (grupos III e IV, respectivamente) foi a presença no vítreo, de raros linfócitos e eosinófilos, sem comprometimento retiniano e sem significado clínico (figura 2). A única alteração clinicamente significativa foi uma reação inflamatória com presença de fibrina no vítreo posterior, porém sem alterações na camada de células ganglionares (figura 3) nos dois olhos de um coelho que foi submetido a duas e três aplicações de infliximab.

Estatisticamente, como só houve alterações nos olhos de um único coelho, o teste exato de Fisher mostrou um valor de p de 1.0, ou seja, não há diferença estatística entre os olhos submetidos à injeção de BSS e duas e três aplicações de infliximab. Dessa maneira, a alteração encontrada nos dois olhos de um único coelho não é estatisticamente significativa.

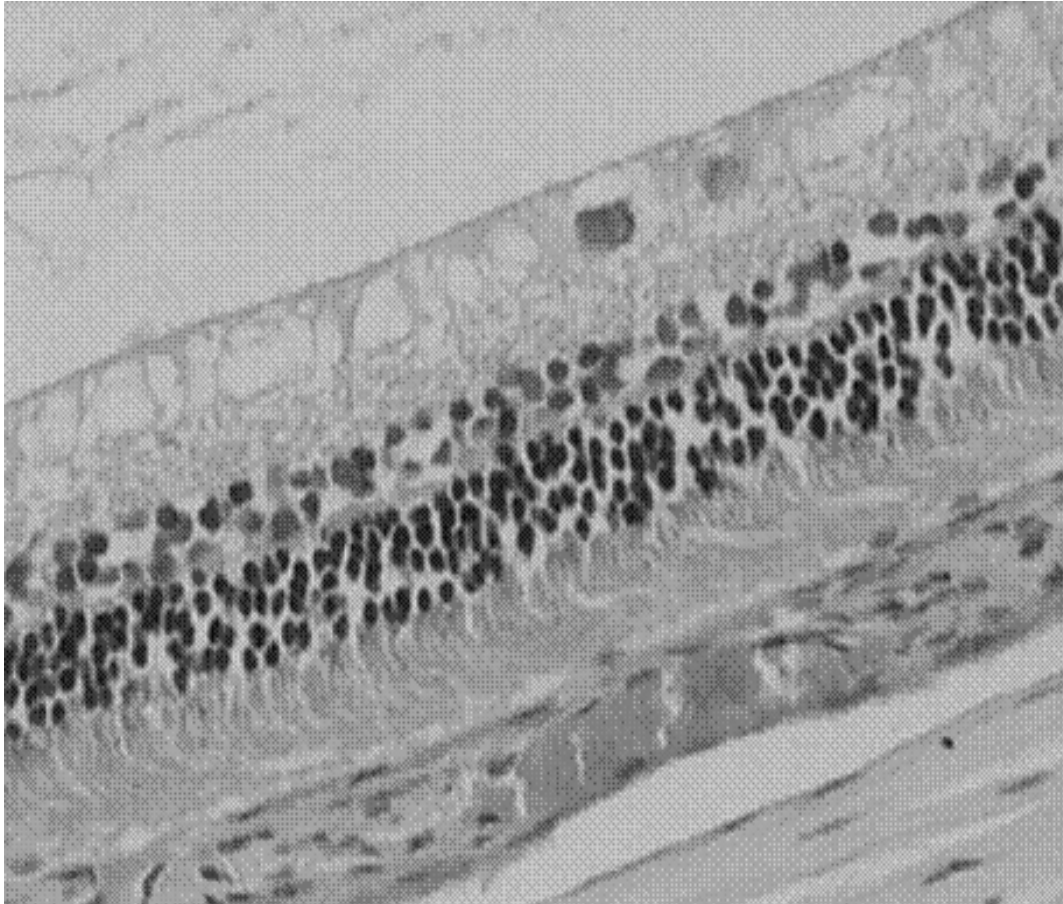


Figura 1 – Olho de coelho albino após três aplicações de infliximabe mostrando cito arquitetura retiniana normal

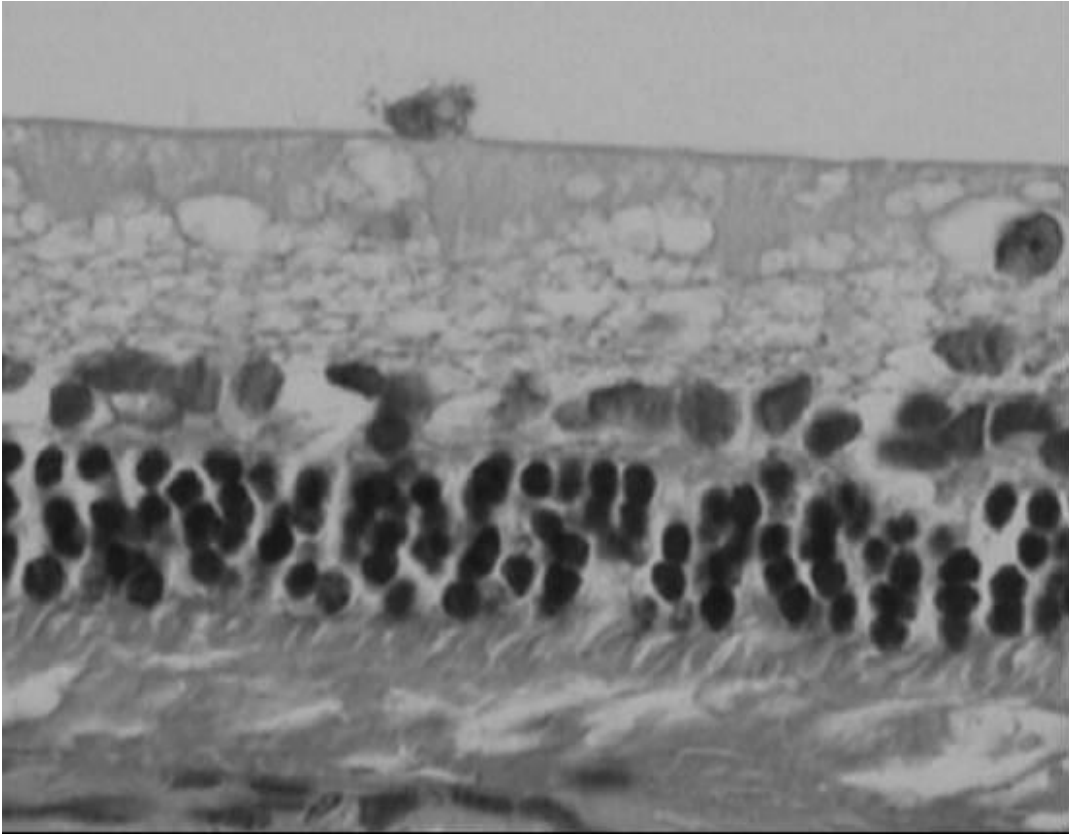


Figura 2. Presença de um linfócito no vítreo e retina de aspecto normal

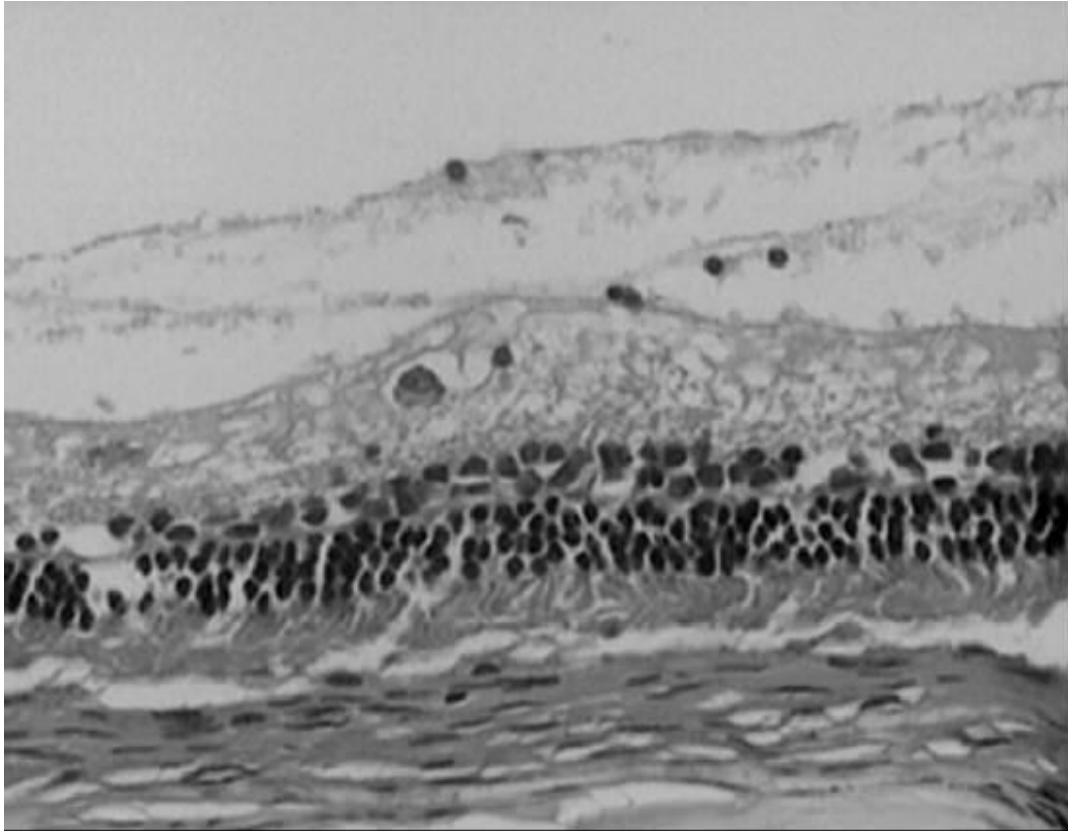


Figura 3. Presença de reação inflamatória com fibrina na interface vítreo-retiniana. Retina de aspecto normal

4. DISCUSSÃO

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

Os primeiros trabalhos com infliximabe intravítreo foram feitos em coelhos albinos (GIANSANTI, 2008). Diferentes doses foram injetadas no vítreo, e estudos clínicos, eletroretinográficos e histológicos indicaram que dosagem de 1,7 mg provou ser segura para a retina. Doses acima de 3,3 mg causaram significante edema do nervo óptico. Em outro estudo (THEODOSSIADIS, 2009), de doses crescentes de injeções intravítreas de infliximabe, mostrou, após 45 dias, alterações nas células de retina com doses superiores a 5 mg. Concluiu-se que 2 mg é uma dose segura para a retina de coelhos. Estudos realizados em coelhos, com a indução de uveíte com uso de endotoxina da salmonela (HOSSEINI, 2009)

demonstraram que o uso de infliximab intravítreo, além de não provocar toxicidade, suprimia a inflamação provocada pela endotoxina.

A primeira experiência com o uso de infliximabe por via intravítrea em humanos ocorreu em pacientes com degeneração macular relacionada à idade (DMRI), relatada em um artigo (LIARAKOS, 2009), em que os autores apresentaram um estudo realizado em três pacientes que não obtiveram bons resultados com ranibizumabe e, quando submetidos a duas aplicações intravítreas de infliximab, apresentaram melhora na acuidade visual e diminuição da espessura foveolar, com utilização de uma dosagem de 2 mg, sem efeitos colaterais.

Os estudos do uso de infliximab intravítreo em coelhos, até o presente momento, utilizaram sempre uma única aplicação com resultados convincentes da segurança dessa droga (SFIKAKIS, 2005; GIANANTI, 2008). O presente estudo avaliou os efeitos histológicos na retina de coelhos após duas e três aplicações de infliximab em intervalos mensais. O volume e a dosagem utilizados (0,06 ml/2 mg) foram bem tolerados pelos olhos dos coelhos, não causando aumento da pressão intra ocular. A única alteração histológica notada foi a presença no vítreo de raros linfócitos e eosinófilos, sem significado clínico. Esta alteração foi encontrada tanto em olhos submetidos a duas como a três aplicações de infliximabe.

Esses achados não apresentaram alterações histológicas na retina sensorial, epitélio pigmentar e coróide, seja na morfologia das células ou na espessura das camadas. Provavelmente tratam-se somente de uma discreta reação inflamatória vítrea ou micro-hemorragias causadas pela injeção intravítrea, não tendo significado clínico e não representando reação tóxica ao medicamento.

Em dois olhos de um mesmo coelho, submetido a duas e três aplicações de infliximab, notou-se reação inflamatória bem mais acentuada, com aparecimento de material fibrinóide no vítreo posterior, sem comprometimento da retina sensorial, que pode ou não estar relacionado ao uso da droga, mas sem valor estatístico. Possíveis razões para a resposta inflamatória à injeção intravítrea de infliximab incluem: reações ao anticorpo monoclonal, a proteínas desconhecidas ou a contaminações presentes com o uso da droga.

Deve-se ter em mente também que infliximab, 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 esta espécie animal.

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 intra-ocular de duas e três aplicações de infliximab.

5. CONCLUSÕES/ CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a avaliação anatomopatológica, conclui-se que duas e três injeções intravítreas de infliximab, na dosagem de 2 mg, em intervalos mensais, mostraram-se seguras em coelhos, por não produzirem alterações tóxicas em seu tecido retiniano e coróide. Estudos clínicos devem ser realizados para melhor avaliação da segurança do uso dessa substância, por via intravítrea, em seres humanos.

6. REFERÊNCIAS

LOCKSLEY, R. M.; KILLEN, N.; LEONARDO, Mj. **The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.** Cell, v.104, n.4, p. 487-501, 2001.

MAIM, R.; ST CLAIR, E. W. W.; BREEDVED, F, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid placebo en rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. **ATTRACT Study Group. Lancet**, v.354, n.9194, p.1932-1939, 2000.

LEWIS, J.D. Anti-TNF antibodies for Crohn's disease-in pursuit of the perfect clinical trial. **N Engl J Med.** 2007; 357(3):296-298.

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

DIAMANTI, A.; CASTRO, M.; PAPADATOU, B.; FERRETI, F.; GAMBARARA, M. Severe anaphylactic reaction to infliximab in pediatric patients with Crohns disease. **J Pediatric**, v.140, p.636-637, 2002.

MOHAN, N.; EDWARDS, E. T.; CUPPS, T. R. et al. Demyelization occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.44, p.2862-2869, 2001.

ELLERIN, T.; RUBIN, R. H.; WEINBLATT, M. E. et al. Infections and anti-tumor necrosis factor a therapy. **Arthritis Rheum.**, v.48, p. 3013-3021, 2003.

SMITH, K. J; STELTON, H. G. Rapid onset of cutaneous squamous cell carcinoma in patients with rheumatoid arthritis after starting TNF alfa receptor IgG1-Fc fusion complex therapy. **J Am Acad Dermatology**, v.45, p. 953-956, 2001.

SFIKAKIS, P.P.; MARKLOMICHELAKIS, N. N.; THEODOSSIADIS, P. G.; GRIGORIPOULOS, V.; KATSILAMBROS, N. **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.

GIANSANTI, F.; RAMAZZOTTI, M.; VANNOZZI, L.; RAPIZZI, E.; FIORE, T.; IACCHERI, B.; INNOCENTI, D.; MONCINI, D.; MENCHINI, U. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.49, p. 1151-1156, 2008.

LIARAKOS, V.S.; SFIKAKIS, P.P.; CHAROSIS, A.; AGROGIANNIS, G.; KAVANTZAS, N.; VERGADOS, I. A. Intravitreal administration of the anti-TNF monoclonal antibody infliximab in the rabbit. **Graeffes Arch Ophthalmol.** v.247, p. 273-281, 2009.

HOSSEINI, H.; SAFAEL, A.; KHALILI, M. R.; NOWROOZADEH, B.; EGHTEDARI, M.; NOWROOZIZADEH, S.; TOLIDE-LE, H. Intravitreal infliximab in experimental endotoxin-induced uveitis. **Eur J Ophthalmol.**, v.19, n.5, p. 818-823, 2009.

THEODOSSIADIS, P. G.; LIARAKOS, V. S.; SFIKAKIS, P. P.; VERGADOS, I. A. Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration. **Am J Ophthalmol.**, v.147, p. 761-763, 2009.