

ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ELETRORRETIÓGRAFICAS NA RETINA DE COELHOS APÓS A INJEÇÃO INTRAVÍTREA DE INFLIXIMAB

Walter Ludwig Armin Schroff¹, Marcos Pereira de Ávila², Alan Ricardo Rassi³

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

Endereço eletrônico: walterludy@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: infliximab, coelho, eletrorretinografia.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência na regulação da produção de determinadas citocinas dentro do cenário inflamatório, pode levar à ativação de células responsáveis pela reação de imunidade e, também, à resposta inflamatória crônica com o consequente dano tecidual.

O fator de necrose tumoral alfa (FNTA) é uma destas citocinas liberadas em resposta à infecção ou injúria imunológica. Este fator promove inflamação não só por toxicidade celular direta, mas também por vários mecanismos indiretos, dentre os quais se incluem a regulação da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, adesão molecular, mediadores do ácido araquidônico, liberação de espécies de oxigênio e nitrogênio reativos e fatores angiogênicos (LOCKSLEY,2001).

Há a associação entre o FNTA e as doenças inflamatórias e sua inibição farmacológica vêm apresentando resultados promissores na terapia de condições como a artrite reumatóide (MAIM,2000) e a espondilite anquilosante (LEWIS,2007). Além disto, estudos em animais e humanos sugerem que tal citocina tem importante papel na iniciação e prolongamento da uveíte experimental (FORREST,2004).

O FNTA está, ainda, sob investigação na angiogênese retiniana. Experimentos em coelhos (UEDA,2003) demonstraram que este fator é capaz de induzir a formação de neovasos in vivo através de suas propriedades inflamatórias.

- 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

Infliximab (Remicade: Roche, Mannheim, Germany) é uma imunoglobulina quimérica (IgG1 anticorpo humano-rato) utilizada para promover a inibição da porção ativa solúvel do FNTA. Sua eficácia no tratamento de uveítes tem sido avaliada em estudos clínicos. Em modelos animais, a regressão de neovascularização após tratamento com anti-FNTA tem sido demonstrados (SHI,2006). Dessa forma, o inibidor de FNTA pode ser benéfico em pacientes portadores de degeneração macular relacionado à idade e em pacientes com inflamação ocular, sabidamente caracterizada pela neoangiogênese.

Sabe-se que esta imunoglobulina, uma vez quimérica (apresenta porção de proteína de camundongo) tem grande potencial imunogênico, podendo induzir a produção de anticorpos contra a droga. Titulações elevadas destes anticorpos associam-se a eficácia baixa e reações de hipersensibilidade (rash cutâneo). Há ainda a possibilidade de ocorrer uma reação aguda à infusão endovenosa de Infliximab em 5% dos casos (CHIEFETZ,2004), caracterizada por febre, tremores, prurido, eritema, urticária, sintomas torácicos, náuseas e vômitos, mialgia, desconforto abdominal, odinofagia e astenia.

Existe ainda a possibilidade de outras manifestações indesejáveis tais como doenças auto-ímmunes (STRUNK,2006), propensão para infecções como toxoplasmose, neuropatia óptica anterior bilateral e aumento de risco de malignidade.

Baseado na maior quantidade de efeitos colaterais associados à terapia sistêmica com o infliximab, a injeção intravítrea com uma quantidade infinitamente menor da droga, em pacientes previamente selecionados, pode levar a uma redução significativa dos paraefeitos. Esse estudo visa estabelecer a viabilidade desse procedimento em humanos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo analisar os resultados das eletrorretinografias da retina e do nervo óptico dos coelhos após a injeção intravítrea de infliximab

3. METODOLOGIA

Foram estudados doze coelhos albinos, da raça New Zealand, com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Humanas e Animais da Universidade Federal de Goiás. Eles 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. Foram divididos em quatro grupos. Dois olhos foram submetidos a duas aplicações de solução salina balanceada (BSS), dois olhos foram submetidos a três aplicações de BSS, dez olhos foram submetidos a duas aplicações de infliximabe e dez olhos a três aplicações de infliximabe. Infliximabe (Remicade 100 mgtm) foi reconstituída com 3 ml de solução salina, tendo sido injetado em cada olho 0,06 ml da solução (2 mg de infliximabe). Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina e cetamina por via intramuscular e submetidos a exame oftalmológico oftalmoscopia eletrorretinográfico. As injeções intravítreas foram feitas a dois milímetros do limbo supero temporal. Os olhos foram dilatados com fenilefrina e cicloplégico. Foi 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. Essas fatias foram incluídas em parafina e realizados cortes em micrótomos na espessura de 5 micrômetros. Os cortes foram corados pela técnica hematoxilina-eosina. Exames foram realizados em microscópio óptico Olympus e as lâminas foram fotografadas com câmera digital.

A Eletrorretinografia foi realizada após dilatação e adaptação ao escuro por dez minutos com luz de fundo da cúpula contraste. O exame foi gravado no aparelho alemão Roland Consult, em mesa adaptada para exames de animais. Foi utilizado eletrodo corneano unipolar para animais, diâmetro de 11 mm. O eletrodo negativo foi localizado na língua, e o terra no pavilhão auricular. Foi realizada fase fotópica para avaliação do sistema de cones, em sala escura, após adaptação ao claro, com luz do fundo da cúpula durante dez minutos. Todos os estímulos foram repetidos três vezes com flashes fotópicos. O sinal biológico foi amplificado e foram analisadas as amplitudes pico a pico das ondas e tempo de latência. A diminuição da amplitude maior que 30% foi considerada anormal.

4. RESULTADOS

O exame oftalmológico dos olhos dos coelhos 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. Exame com

oftalmoscópio binocular indireto não constatou descolamento de retina, alterações na retina e no nervo óptico ou presença de opacificações e sinais inflamatórios no vítreo.

Nos exames das ondas a e b, não foram encontradas diferenças significativas tanto na morfologia quanto nas amplitudes dessas ondas. O eletrorretinograma revelou presença de ondas detectáveis durante todo o exame em todos os grupos, com resposta normal, tanto em relação à amplitude quanto 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 revelaram alterações morfológicas e funcionais em nenhum dos grupos.

Para a análise estatística das avaliações eletrorretinográficas entre as duas visitas, primeiro, realizou-se o teste F de homogeneidade de variância. Quando não foi encontrada diferença de variâncias, utilizou-se o teste T pareado para efetuar as comparações entre as visitas. Após análise pelos testes estatísticos, observou-se um único caso em que houve diferença de variâncias ocorrido na comparação entre a primeira e a segunda visita para P1 (20 ms) de olho direito e, nesse caso, foi utilizado alternativamente o teste não paramétrico de postos com sinais de Wilcoxon. Em todas as comparações efetuadas não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a primeira e a segunda visita. Avaliação eletrorretinográfica

5. 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, eletrorretinográficos e histológicos indicaram que dosagem de 1,7 mg provou ser segura para a retina. Doses acima de 3,3 mg causaram significativo edema do nervo óptico. Em outro estudo (THEODOSSIADIS,2009), doses crescentes de injeções intra vítreas 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) demonstraram que o uso de infliximabe intravítreo, além de não provocar toxicidade, suprimia a inflamação provocada pela endotoxina.

Um protocolo clínico, financiado por National Eye Institute, está recrutando participantes para determinar se infliximabe ou outras drogas imunossupressoras podem ser usadas no tratamento de membrana neovascular em Degeneração macular relacionada a idade.

Os estudos do uso de infliximabe intravítreo em coelhos, até o presente momento, utilizaram sempre uma única aplicação com resultados convincentes da segurança dessa droga (GIANSANTI, 2008; SFIKAKIS, 2005). O presente estudo avaliou os efeitos eletrorretinográficos da retina de coelhos após duas e três aplicações de infliximabe em intervalos mensais. O volume e dosagem utilizados (0,06 ml/2 mg) foram bem tolerado pelos olhos dos coelhos, não causando aumento da pressão intra ocular. Em dois olhos de um mesmo coelho, submetido a duas e três aplicações de infliximabe 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 do medicamento, mas sem valor estatístico. Possíveis razões para a resposta inflamatória à injeção intravítrea de infliximabe incluem reações ao anticorpo monoclonal, a proteínas desconhecidas ou a contaminações presentes com o uso da droga.

O infliximabe é um anticorpo monoclonal 35% murino e 65% humano. Por causa de sua composição, ele pode incitar uma reação imunogênica e levar à produção de anticorpos, sobretudo se a dosagem inicial for baixa ou não sustentada. É também possível que impurezas protéicas ou contaminações desconhecidas tenham sido responsáveis por esta reação inflamatória. Deve-se ter em mente também que 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 esta espécie animal.

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, o que corrobora a não toxicidade do uso intra-ocular de duas e três aplicações de infliximabe.

6. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a avaliação dos exames eletrorretinográficos, podemos concluir que duas ou três injeções de infliximabe intravítreo na dosagem de 2 mg mostram-se seguras em coelhos, por não produzirem alterações tóxicas no seu tecido retiniano e coróide, com repercussão

eletrorretinográfica e clínica . Estudos clínicos devem ser realizados para melhor avaliação da segurança do uso dessa substância, por via intravítrea, em seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

LOCKSLEY, R.M.; KILLEN, N.; LEONARDO, M.J. **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. **ATTRATCT 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**,v.357, p. 296-298, 2007.

FORREST, J.V.; LIVERSIDGE, J.; COPE, A.P. The role of tumour necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). **Prog Retin Eye Res**, v.23, p617-637, 2004.

UEDA T; UEDA T; FUKUDA S, et al. Lipid hydroperoxide-induced tumor necrosis factor (TNF)-apha, vascula endothelial growth factor and neovascularization in the rabbit cornea: effect of TNF inhibition. **Angiogenesis**, v.1, p174-184, 2003.

SHI, X; SEMKIVA, I; MÜTHER, O.S; DELL, S; KOCIOK, N; JOUSSEN, A.M . Inhibition of TNF-alpha reduces laser-induced cloroidal neovascularization. **Exp Eye Res**, v.83, p1325-1334, 2006.

CHIEFETZ, A; SMEDLEY, M. MARTIN s et al. The incidence and management. **Am J Gastroenterol**, v.98, p1315-24, 2004.

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, p252, 2006.

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.

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.

HOSSEINI, H.; SAFAEL, A.; KHALILI, M. R.; NOWROOIZADEH, 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.

SFIKAKIS, P.P.; MARKLOMICHELAKIS, N. N.; THEODOSSIADIS, P. G.; GRIGORIOPOULOS, 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.