

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ALEXANDRE AUGUSTO CABRAL DE MELLO VENTURA

ANÁLISE DA TOXICIDADE RETINIANA
DA INJEÇÃO INTRA-VÍTREA DE
OCTREOTIDA EM OLHOS DE
COELHOS NÃO ALBINOS

Brasília

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 989132.

V468a Ventura, Alexandre Augusto Cabral de Mello.
Análise da toxicidade retiniana da injeção intra-vítrea de octreotida (sandostatina®) em olhos de coelhos não albinos / Alexandre Augusto Cabral de Mello Ventura. -- 2011.
xvii, 131 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, 2011.
Inclui bibliografia.
Orientação: Marcos Pereira de Ávila.

1. Retina - Doenças. 2. Olhos - Doenças - Tratamento.
I. Ávila, Marcos. II. Título.

CDU 617.735

ALEXANDRE AUGUSTO CABRAL DE MELLO VENTURA

**ANÁLISE DA TOXICIDADE RETINIANA DA INJEÇÃO
INTRA-VÍTREA DE OCTREOTIDA EM OLHOS DE
COELHOS NÃO ALBINOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pereira de Ávila

Brasília

2011

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: ALEXANDRE AUGUSTO CABRAL DE MELLO VENTURA

Orientador: PROF. DR. MARCOS PEREIRA DE ÁVILA

Membros:

- 1. Prof. Dr. Marcos Pereira de Ávila (presidente) – UFG & UnB**
- 2. Profa. Dra. Maria Regina Catai Chalita (membro) – UnB**
- 3. Prof. Dr. David Leonardo Cruvinel Isaac (membro) – UFG**
- 4. Prof. Dr. José Ricardo Costa (membro) – UFG**
- 5. Prof. Dr. Francisco Eduardo Lima (membro) – UFG**
- 6. Prof. Dr. Antônio Eduardo Pereira (suplente) – UNIDERP**

Data: 12/05/2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, professores e amigos que me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos durante minha educação.

Em especial:

A minha querida esposa Manuela pela eterna compreensão, amor, apoio e companheirismo em mais esta conquista, pela dedicação com nossos filhos, essenciais na construção de nossa família, permitindo, assim, meu empenho e tempo dedicados neste trabalho;

Aos meus filhos, Letícia e Alexandre, razões da minha existência, pela compreensão nas minhas ausências, pelos constantes momentos de felicidade com suas presenças sendo motivo de entusiasmo e paixão pela vida;

Ao meu pai, Fernando Ventura, meu exemplo como oftalmologista e como ser humano, que sempre me ensinou os princípios da vida: caráter, gratidão e lealdade. Obrigado pelo incentivo e apoio, financeiro e emocional, por acreditar em meu projeto de vida até hoje, pela carreira pessoal, acadêmica e profissional;

À minha mãe, Graça Ventura, que sempre esteve disponível para os filhos, abdicando de sua vida em prol de nossa educação e crescimento acadêmico e profissional. Obrigado pelo constante apoio desde os primeiros passos e carinho e amor incondicional demonstrados durante todo este caminho;

Às minhas irmãs, Fernanda e Catarina, que inconscientemente contribuíram para a minha formação, tanto pessoal quanto profissional;

Aos meus professores, Alvacir Raposo, Carlos Brandt, Fernando Oréfice, Leopoldo Luiz dos Santos Neto, Hilel Lewis, Andrew Schachat, Arun Singh, Peter Kaiser, Jonathan Sears, Careen Lowder, Elias Trabulsi, e ao meu sempre orientador Marcos Ávila;

A todos vocês, minha eterna e mais sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que ele tem feito de bom por mim, pela fé, pela vida honesta, pelo trabalho e estudo, por minha saúde e garra de seguir em frente de cabeça erguida, sempre com paciência e perseverança praticando o bem;

Ao Professor Doutor Marcos Ávila, querido amigo e orientador, não só do meu Doutorado, mais sim da vida e da oftalmologia, obrigado pelos conselhos, por sempre demonstrar acreditar no meu potencial, pelas oportunidades oferecidas, por me ajudar a escolher que caminhos seguir, por ser uma espécie de segundo pai e pelo exemplo pessoal e profissional que carrego comigo até hoje;

Ao Professor Doutor Leopoldo Luiz dos Santos Neto, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela amizade construída e momentos de lembranças do nosso Pernambuco durante minha temporada em Brasília;

Aos Professores Doutores envolvidos em todos os créditos pagos durante estes anos em que participei do programa e em especial aos funcionários da Pós-Graduação Alessandro, Daniele e Jaqueline;

À Professora Doutora Marise Moreira, médica patologista do Hospital das Clínicas da Univesidade Federal de Goiás, pela ajuda na avaliação histológica e ensinamentos na montagem e corte das lâminas deste estudo;

À Roberto Tedesco, biólogo e Doutor da Fundação Oswaldo Cruz, pela validação das lâminas e ensinamentos;

À Professora Doutora Patrícia Jungmann, médica patologista do Hospital das Clínicas da Univesidade Federal de Pernambuco, pela ajuda na avaliação histológica e avaliação qualitativa do estudo;

Aos grandes amigos, desde a época da Residência Médica em Oftalmologia, João Arraes e Rodrigo Almeida, sem vocês este trabalho não seria o mesmo;

À Elilson Batista, médico veterinário, pelo apoio essencial ao desenvolvimento de nossa pesquisa e pelo seu amor aos animais do estudo;

Ao meu professor de estatística José Natal Figueirôa por toda revisão dos meus dados e ajuda na construção das tabelas, quadros e gráfico;

Aos professores da minha banca de qualificação: Maria Regina Catai Chalita, Antônio Eduardo Pereira, José Ricardo Costa e Alípio de Sousa Neto; e aos professores da minha banca de defesa (pág. iv) por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho;

Aos meus amigos oftalmologistas do Centro-Oeste que indiretamente ajudaram na conclusão da minha pesquisa: Arnaldo, José Ricardo, Wener, David, Humberto, Tatiana, Marco, Manoel, Douglas e toda equipe do CBV, CEROF e CBCO;

À minha secretária Rousian Ingrid pela ajuda na conclusão final do trabalho e toda a formatação.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Tabelas, quadros, gráfico, figuras e anexos.....	x
Símbolos, Siglas e abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	18
1.1 Apresentação do problema.....	18
1.2 A neovascularização ocular.....	20
1.3 A angiogênese ocular.....	23
1.4 Abordagem terapêutica atual.....	24
1.5 Abordagem terapêutica futura.....	34
1.6 Justificativa da investigação.....	39
1.7 A octreotida (sandostatin®).....	40
1.8 A retina humana.....	40
1.9 A retina do coelho.....	44
1.10 A toxicidade da retina.....	46
2. Objetivos.....	50
3. Métodos.....	51
3.1 Desenho do estudo.....	51
3.2 Considerações éticas.....	51
3.3 Os animais.....	51
3.4 A droga.....	55
3.5 Grupos de estudo.....	55
3.6 Momentos experimentais.....	57
3.7 Procedimentos.....	57
3.8 A análise histológica da retina.....	61
3.9 Expressão dos resultados e análise estatística.....	62
4 Resultados.....	63
4.1 Os efeitos do procedimento de injeção intra-vítrea em olhos de coelhos não albinos.....	66
4.2 Os efeitos da octreotida em olhos de coelhos não albinos a análise histológica.....	67
4.2.1 Grupo controle.....	67
4.2.2 Grupo placebo.....	70
4.2.3 Grupo 1.....	72
4.2.4 Grupo 2.....	73
4.2.5 Análise das espessuras das camadas da retina neurossensorial.....	74
4.2.6 Análise do epitélio pigmentado da retina.....	76
5. Discussão.....	78
5.1 Discussão da metodologia.....	78

5.2	A injeção intra-vítrea em olhos de coelhos não albinos.....	79
5.3	Os efeitos da octreotida em olhos de coelhos não albinos.....	81
5.3.1	Análise da retina neurosensorial.....	81
5.3.2	Análise do epitélio pigmentado da retina.....	83
5.4	Perspectivas futuras.....	85
6.	Conclusões.....	86
7.	Referências.....	87
8.	Outras fontes consultadas.....	106
10.	Anexos.....	107
	Anexo I – parecer do comitê de ética.....	107
	Anexo II – bula do sandostatin® (novartis).....	108
	Anexo III – documento de isenção de conflitos de interesse..	131

TABELAS, QUADROS, GRÁFICO, FIGURAS E ANEXOS

Lista das Tabelas

Tabela 01	Distribuição de peso e sexo dos coelhos	52
Tabela 02	Distribuição dos olhos dos coelhos submetidos à injeção intra-vítrea nos grupos de estudo.	56
Tabela 03	Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo controle com respectivos peso e sexo	63
Tabela 04	Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo placebo com respectivos peso e sexo	63
Tabela 05	Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo 1 com respectivos peso e sexo	64
Tabela 06	Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo 2 com respectivos peso e sexo	64
Tabela 07	Média e desvio padrão do peso e distribuição do sexo dos coelhos, segundo os grupos do estudo.	65
Tabela 08	Estatísticas descritivas (média e desvio padrão) da PIO, de acordo com a lateralidade do olho e o momento da mensuração.	65
Tabela 09	Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo controle.	70
Tabela 10	Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo placebo	71
Tabela 11	Comparação das espessuras das camadas de EPR, FR, CNE, CNI e do número de estratos celulares na CNE entre os grupos de controle e placebo	72
Tabela 12	Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo 1.	73
Tabela 13	Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo 2.	74

Tabela 14	Comparação das espessuras das camadas de EPR, FR, CNE, CNI e do número de estratos celulares na CNE entre os grupos de controle e placebo e do grupo 1.	75
Tabela 15	Comparação das espessuras das camadas de EPR, FR, CNE, CNI e do número de estratos celulares na CNE entre o grupo placebo e o grupo 2.	76
Tabela 16	Comparação das espessuras do EPR entre o grupo placebo e os grupos 1 e 2	77

Lista de Quadros

Quadro 1	Sinais e sintomas da neovascularização ocular.	21
Quadro 2	Condições onde a neovascularização ocular pode ocorrer.	21

Lista de Gráfico

Gráfico 1	Média da PIO, de acordo com a lateralidade do olho e o momento da mensuração.	66
-----------	---	----

Lista de Figuras

Figura 01	Desenho esquemático do olho humano.	41
Figura 02	Desenho esquemático da retina humana.	41
Figura 03	Corte histológico da retina de olho humano.	42
Figura 04	A. Desenho esquemático de fundo do olho pigmentado de coelho B. Retinografia de retina normal de coelho	45
Figura 05	A. Desenho esquemático de corte axial vertical do olho do coelho. B. Desenho esquemático de corte axial vertical do olho do humano.	46
Figura 06	Descolamento de retina.	48
Figura 07	Artefato de preparação da peça com destacamento da retina	48
Figura 08	Exemplo de lesão aos fotorreceptores.	49

Figura 09	Identificação por meio de tatuagem numérica na orelha de cada coelho.	53
Figura 10	Gaiola individual metálica própria para coelhos adultos.	53
Figura 11	Embalagem de Octreotida (Sandostatin®) utilizada no estudo.	55
Figura 12	Injeção intra-vítrea a 2mm do limbo depois de adequada anti-sepsia e isolamento ciliar	59
Figura 13	Punção da veia lateral da orelha do coelho.	60
Figura 14	Grupo Controle - olho direito do coelho C.	67
Figura 15	Grupo Controle - olho direito do coelho C.	68
Figura 16	Grupo Controle.	68
Figura 17	Grupo Controle.	69
Figura 18	Grupo Controle. Camada de células ganglionares.	69
Figura 19	Grupo Controle, olho direito do coelho C	70
Figura 20	Grupo Placebo, olho esquerdo do coelho 2.	71
Figura 21	Grupo 1	72
Figura 22	Grupo 2	73
Figura 23	Comparação da espessura da camada de fotorreceptores (seta amarela). A. grupo controle, B. grupo placebo (solução salina balanceada - BSS), C. grupo 1 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida) D. grupo 2 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida).	74
Figura 24	Comparação da espessura da Camada Nuclear Externa (seta vermelha) e da Camada Nuclear Interna (seta verde). A. grupo controle,	76

	B. grupo placebo (solução salina balanceada - BSS),	
	C. grupo 1 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida)	
	D. grupo 2 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida).	
Figura 25	Fotos do EPR representativas dos quatro grupos de estudo.	76
	A. grupo controle,	
	B. grupo placebo (solução salina balanceada - BSS),	
	C. grupo 1 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida)	
	D. grupo 2 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida).	

Lista dos Anexos

Anexo I	parecer do comitê de ética	108
Anexo II	bula do sandostatin® (novartis)	109
Anexo III	documento de isenção de conflitos de interesse	131

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

µm:	Micrômetros
%	Por cento
°C:	Graus Celsius
ACR:	Artéria central da retina
ANOVA:	Análise de Variância
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARVO:	Sigla do inglês, “ <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i> ”
BSS:	Solução salina balanceada
CCG:	Camada de células ganglionares
CEROF:	Centro de Referência em Oftalmologia
CFN:	Camada de Fibras Nervosas
CNE:	Camada Nuclear Externa
CNI:	Camada Nuclear Interna
CPE:	Camada Plexiforme Externa
CPI:	Camada Plexiforme Interna
DEP	Descolamento do epitélio pigmentado da retina
DM:	Diabete Melitus
DMRI:	Degeneração macular relacionada à idade
DP:	Desvio-padrão
EPR:	Epitélio pigmentado da retina
EVS	Sigla do inglês, “ <i>Endophthalmitis Vitrectomy Study</i> ”
et al:	Termo do Latim que significa: e outros
FDA:	Sigla do inglês, “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
FR:	Fotorreceptores
g:	gramas
GNV:	Glaucoma neovascular
GRUPO 1:	Grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida intra-vítreo
GRUPO 2:	Grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida intra-vítreo
GRUPO P:	Grupo em que foi injetado 0,1ml de solução salina balanceada intra-vítrea
HV:	Hemorragia vítrea
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1:	do inglês, “ <i>insulin-like growth factor-1</i> ”
IV:	Intra-vítreo
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
kD	kiloDalton
LASER:	acrônimo do inglês, “ <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> ”
MEWDS:	Síndrome dos múltiplos pontos brancos evanescentes
mg:	miligramas
mg/cm ²	Miligramma por centímetro quadrado
ml:	mililitros
MLE:	Membrana limitante externa
MLI:	Membrana limitante interna

mm:	milímetros
mm ² :	Milímetros quadrados
MNSR:	Membrana neovascular sub-retiniana
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
nm	Nanometros
OBI:	Oftalmoscopia binocular indireta
OCT	Tomografia de coerência óptica
ORVCR	Oclusão de ramo de veia central da retina
OVCR	Oclusão de veia central da retina
OFF-LABEL:	Termo do inglês que significa: Uso de uma medicação para finalidade diferente daquela aprovada pelos órgãos regulamentadores.
RAP	Proliferação angiomasosa retiniana
RNA _m	RNA mensageiro
RNS:	Retina neurosensorial
RD:	Retinopatia diabética
RDP:	Retinopatia diabética proliferativa
siRNA	Silenciador de RNA
PIGF	Sigla do inglês, " <i>Placenta Growth Factor</i> "
PIO:	Pressão intra-ocular
PDT:	do inglês, " <i>Photodynamic Therapy</i> "
UFG:	Universidade Federal de Goiás
UnB:	Universidade de Brasília
VCR:	Veia central da retina
VEGF:	Sigla do inglês, " <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> "
VEGF-R:	Receptor do VEGF

RESUMO

INTRODUÇÃO: Doenças oculares relacionadas com neovascularizações são a principal causa de cegueira irreversível atualmente na população adulta mundial. A busca por novas drogas e terapias para o tratamento das doenças oculares e a manutenção da visão continua sendo um desafio. **OBJETIVOS:** Avaliar a toxicidade sobre a retina neurosensorial (RNS) e epitélio pigmentado da retina (EPR) da injeção intra-vítrea (IV) de Octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não albinos; avaliar se o aumento súbito do volume vítreo após a injeção IV de 0,1ml de solução salina balanceada (BSS) no olho do coelho leva a danos histológicos na RNS e EPR; e avaliar as complicações clínicas pós-operatórias após a injeção IV em olhos de coelhos. **MÉTODOS:** 20 coelhos não albinos (40 olhos) foram distribuídos em 4 grupos. O Grupo Controle (5 coelhos – 10 olhos), o qual não recebeu injeção IV, foi sacrificado no início do estudo. Os trinta olhos dos 15 coelhos restantes foram distribuídos em 3 grupos (1:1:1): Grupo Placebo (injeção IV de 0,1ml de BSS); Grupo 1 (Grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida intra-vítrea); e Grupo 2 (Grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida intra-vítrea). Os coelhos foram acompanhados por um período de 90 dias após o procedimento, quando então foram submetidos a eutanásia. Todos os coelhos tiveram seus olhos enucleados e avaliados histologicamente. Foram realizadas avaliações clínicas pré e pós-operatória (inspeção do segmento anterior, tonometria de aplanção e oftalmoscopia binocular indireta) e avaliação histológica da morfologia e da espessura das camadas da RNS e EPR. **RESULTADOS:** Não foram observadas complicações clínicas pós-operatórias significantes. A morfologia histológica e espessura das camadas da RNS e EPR não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e placebo, grupo placebo e grupo 1 e grupo placebo e grupo 2. **CONCLUSÕES:** A injeção IV de 0,1ml de Octreotida nas apresentações de 0,1mg/ml e 0,5mg/ml não leva a alterações histológicas tóxicas na RNS e EPR, nem a complicações clínicas pós-operatórias importantes em olhos de coelhos não albinos. A injeção IV de 0,1ml de BSS não leva a danos histológicos ao RNS e ao EPR em olhos de coelhos não albinos.

PALAVRAS-CHAVE: Inibidores da Angiogênese; Degeneração Macular; Neovascularização Ocular; Drogas Anti-Angiogênicas; Toxicidade Retiniana; Octreotida.

ABSTRACT

BACKGROUND: Eye diseases associated with neovascularizations are the leading cause of irreversible blindness in the adult population worldwide nowadays. The search for new drugs and therapies for the treatment of eye pathologies and vision maintenance remains a challenge. **OBJECTIVES:** To evaluate the toxicity of the neurosensory retina (NSR) and retinal pigment epithelium (RPE) of Octreotide (Sandostatin®) intra-vitreous (IV) injection in non-albino rabbit eyes; also evaluate whether the sudden increase of vitreous volume after 0.1ml of balanced salt solution (BSS) IV injection into rabbit eyes leads to histological damage for the RPE and NSR and to evaluate the clinical postoperative complications after IV injection in rabbit eyes. **METHODS:** 20 non-albino rabbits (40 eyes) were divided into four groups. The control group (5 rabbits-10 eyes), which received no IV injection, was sacrificed at baseline. Thirty eyes of the 15 remaining rabbits were distributed into 3 groups (1:1:1): Placebo group (BSS; 0.1ml IV injection), Group 1 (Octreotide 0.1mg/ml; 0.1ml IV injection) and Group 2 (Octreotide 0.5mg/ml; 0.1ml IV injection). The rabbits were followed during a 90 days period after the procedure and sacrificed. All rabbits had their eyes enucleated and histologically examined. Evaluations were made before and after surgery (anterior segment inspection, applanation tonometry and indirect ophthalmoscopy). Histological examination of the NSR and RPE were performed and their morphological features and layer thickness were analyzed. **RESULTS:** No significant postoperative clinical complications were observed. The histological morphology and thickness of the NSR and EPR showed no significant difference between the control and placebo group, the placebo group and group 1 and between the placebo group and group 2. **CONCLUSIONS:** Octreotide 0.1mg/ml and 0.5mg/ml; 0.1ml IV injections does not lead to histological toxicity changes in NSR and EPR, nor important postoperative clinical complications in non-albino rabbit eyes. The BSS; 0.1ml IV injection also does not lead to histological damage to the NSR and the RPE in non-albino rabbit eyes.

KEYWORDS: Angiogenesis Inhibitors; Macular Degeneration; Ocular Neovascularization; Antiangiogenic Drugs; Retinal Toxicity; Octreotide.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do Problema

A neovascularização ocular é de extrema relevância clínica, e um grave problema sócio econômico nos países em desenvolvimento, assim como também, nos países de primeiro mundo, seja pelo seu custo direto de tratamento ou indireto, consequência de uma cegueira legal (visão inferior a 20/200). A grande maioria das doenças que causam grande perda de visão são resultantes das neovascularizações oculares.¹

A neovascularização leva à formação de um composto fibrovascular e seus produtos (sangue, líquido e lipídio), acarreta fibrose e atrofia associadas ao rompimento de delicados tecidos da retina necessários para a formação da visão.² O tratamento, uma vez instalado o quadro neovascular, deve ser realizado com brevidade, a fim de minimizar os danos visuais e proporcionar uma melhor qualidade de vida, sempre que possível.

Doenças oculares relacionadas com neovascularização são a principal causa de cegueira irreversível atualmente na população adulta mundial. Estima-se que cerca de 8 milhões de norte americanos sofram de degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e que nos próximos cinco anos em torno de um milhão de novos casos serão diagnosticados na população com mais de 55 anos. Haverá ainda um incremento de pelo menos 50% até o ano de 2020.³⁻⁷

Com relação à Diabete Melitus (DM) e à retinopatia diabética (RD), a prevalência de diabéticos tipo 2 nos Estados Unidos da América (EUA), que corresponde a 90% do total de diabéticos, é atualmente de acordo com as estatísticas nacionais de 8,3% da população (mais de 25 milhões de pessoas). Contudo, com o crescente aumento dos fatores de risco, em especial a obesidade e do aumento da expectativa de vida, a prevalência da DM apresenta franco aumento. Um terço dos americanos irão desenvolver DM. A diabete é a principal causa de cegueira na população economicamente ativa nos EUA, apresentando cerca de 20 mil novos pacientes cegos todos os anos.⁸⁻¹⁰

Os dados no Brasil, apesar de uma população mais miscigenada, existem. No que tange a DM, estima-se que atinja aproximadamente 8% da população entre 30 e 69 anos de idade, cerca de 17% das pessoas com idade entre 60 e 69 anos e mais de 18% dos indivíduos com mais de 70 anos. A prevalência da retinopatia diabética (RD) varia de 24 a 39,4%, sendo os mais afetados os pacientes que residem fora das regiões metropolitanas. Avaliando-se as estatísticas, chega-se a um número aproximado de 2 milhões de brasileiros com algum grau de RD.^{11, 12}

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), coletados no Censo Demográfico de 2000, no Brasil havia 34 milhões de indivíduos com 55 anos ou mais de idade (20% de sua população total). Cinco milhões (14% da população com idade igual ou superior a 55 anos) de brasileiros são prováveis portadores de DMRI, o que leva à estimativa de que entre 500 e 800 mil pessoas devem portar a forma neovascular da doença no país comparando matematicamente com estudo realizado por Bressler *et al.*³ nos EUA. Isto indica ser a DMRI úmida importante problema de saúde pública em populações dessa faixa etária também na América do Sul, respeitando as diferenças raciais regionais.

Dentre as principais causas de neovascularização ocular podemos citar entre as mais importantes a DMRI na sua forma úmida, a retinopatia diabética proliferativa (RDP), as oclusões vasculares, a retinopatia da prematuridade (ROP) e o glaucoma neovascular (GNV).

O avanço da medicina neonatal elevou a taxa de sobrevivência de recém nascidos cada vez mais prematuros observando-se incremento do número de casos de ROP. Globalmente 50.000 são cegos por conta de ROP, com tendência de aumento deste número principalmente dos casos vindos dos países em desenvolvimento como Brasil, China e Índia.¹³

A retinopatia diabética e as doenças oclusivas da retina também são reflexo do mundo moderno e industrializado. A DM atinge nos dias de hoje cerca de 6,5 a 8% da população mundial e chegará a quase meio bilhão de pessoas em 2030 – 8 a 10% da população do mundo. A hipertensão arterial sistêmica, enorme problema global, causa de um terço de todas as mortes, em especial nos países latino americanos, afeta quase 30% dos adultos, em 2025 serão mais de 1,5 bilhões de hipertensos, e uma grande quantidade de

pacientes com fator de risco para baixa visual atrelados as trombooses vasculares.¹⁴⁻¹⁶

O LASER continua sendo, uma das únicas armas disponíveis, para tratamento de doenças neovasculares do olho, desde a década de 1970, aliando-se ao tratamento fotodestrutivo o advento e uso dos anti-angiogênicos popularizou as injeções intra-vítreas na terapêutica ocular no início deste século. Isso trouxe novas perspectivas e esperança para a maioria dos casos de neovascularização ocular, no entanto, ainda não é o tratamento ideal e definitivo. É necessário a busca por um tratamento, ou combinações de drogas e terapias para controle da neovascularização, evitando, assim, o aumento do número de pacientes com baixa visual ou cegueira.¹⁷⁻²⁰

1.2 A Neovascularização Ocular

O olho, um dos órgãos mais vascularizados do corpo humano, apresenta também um alto poder de crescimento de novos vasos, sendo estes na maioria das vezes, vasos incompetentes. Ao contrário de outros órgãos, como o coração, a neovascularização ocular pode levar a danos irreparáveis, acarretando perda visual permanente parcial ou total. A neovascularização intra-ocular é uma complicação patológica de muitas doenças oftalmológicas que a eleva como uma das causas principais de cegueira no mundo.²¹⁻²³

A formação de novos vasos se origina a partir de um dos dois mecanismos: a vasculogênese ou a angiogênese. A vasculogênese é a formação primária de vasos sanguíneos a partir dos precursores da célula endotelial, os angioblastos, durante o desenvolvimento embrionário e são responsáveis pelos plexos vasculares primitivos primários (coração e seus vasos) e secundários (ligações com alguns órgãos, tais como os pulmões e o baço). A angiogênese é definida pela formação de neovasos de capilares pré-existentes através da proliferação de células endoteliais e divisão do lúmen vascular. No olho acontece também tais mecanismos, vasculogênese imperfeita levará a instalação da ROP; e a angiogênese, na maioria das vezes por conta de isquemia, leva as outras neovascularizações oculares.^{1, 21, 24}

A angiogênese pode ser fisiológica, pois está relacionada à cicatrização de feridas, gravidez, ciclo uterino e vascularização de órgãos vitais como o

cérebro, crescimento do cabelo, e possivelmente regulação da pressão arterial; mas pode ter caráter patológico como nos tumores e na neovascularização ocular.^{1, 25-28}

Anatomicamente, o aparecimento de neovasos, pode ocorrer em qualquer parte do globo ocular: córnea, íris, corpo ciliar, ângulo (íris / esclera), retina, coróide, disco óptico, etc. As causas (degenerativas, vasculares, inflamatórias, infecciosas, traumáticas, senis, etc.), os sinais e sintomas também são variados (Quadro 1, 2).

Quadro 1: Sinais e sintomas da neovascularização ocular.

Dor, hiperemia, baixa da acuidade visual, edema de córnea, elevação da pressão intra-ocular, presença de neovasos na íris, hemorragia vítrea.

Quadro 2: Condições onde a neovascularização ocular pode ocorrer.

Degeneração macular relacionada à idade, estrias angióides, oclusões vasculares, retinopatia da prematuridade, neuropatia óptica isquêmica anterior, endocardite bacteriana, doença de Best, retinocoroidopatia birdshot, hemangioma de coróide, nevus de coróide, não perfusão coroideana, osteoma de coróide, rotura de coróide, coroidermia, descolamento de retina crônico, coloboma de retina, diabete mellitus, drusas, endoftalmite endógena, harmatomas, fundus flavimaculatus, idiopático, buraco de mácula, melanoma maligno, glomerulonefrite membranoproliferativa (tipo II), corpo estranho intra-ocular, síndrome de Morning-glory, síndrome dos múltiplos pontos brancos evanescentes (MEWDS), miopia, glioma do nervo óptico, fosseta de disco óptico, fotocoagulação a LASER, síndrome da histoplasmose ocular presumida, coroidopatia puntata, retinopatia por radiação, crioterapia, retinite pigmentosa, coloboma retinocoroideano, rubéola, sarcoidose, coroidite serpigínosa, toxoplasmose ocular, tuberculose, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, glaucoma neovascular.

Estudos sobre o desenvolvimento da retina mostram a invasão de vasos na retina recém formada, nos casos de ROP. Existem duas teorias sobre a sua patogênese: a primeira defendida por Kretzer e Hittner refere que as células mesênquimais fusiformes da retina imatura quando expostas a condições hiperóxicas extra-uterinas desenvolvem junções. Estas junções interferem com a formação vascular normal, provocando uma resposta neovascular. A segunda defendida por Ashton teoriza que existam duas fases: a fase inicial hiperóxica que provoca destruição do endotélio capilar das células da retina, seguida por outra onde há deprivação de oxigênio, acarretando em isquemia e proliferação neovascular provocada por fatores angiogênicos.^{29, 30}

No caso da RD e outras vasculopatias retinianas há neovascularização por não perfusão capilar com conseqüente isquemia, levando à difusão de fatores angiogênicos. A angiogênese retiniana é a conseqüência, portanto, de uma resposta vascular anormal à isquemia ou hipóxia, que leva a proliferação de células vasculares endoteliais através da membrana limitante interna (MLI) para o vítreo podendo levar a sérias complicações como hemorragia vítrea (HV) ou descolamento tracional retiniano. Por outro lado o controle desta isquemia através de fotocoagulação a LASER ou crioblação leva a regressão dos neovasos e prevenção das complicações.^{1, 23, 24, 31-34}

Quando se fala sobre angiogênese coroideana, em especial a neovascularização que ocorre em pacientes com DMRI, não é observada hipóxia ou isquemia, até porque esta região é irrigada pelos vasos da coróide ricos em oxigênio e nutrientes. O que ocorre é uma degeneração e conseqüente enfraquecimento da membrana de Bruch, membrana limitante entre a retina e coróide, que permite a passagem de vasos coroideanos para o espaço subretiniano, causando exsudação subretiniana e hemorragia. É defendido um modelo no qual existe inflamação local associado à liberação de fatores de crescimento como o “vascular endothelial growth factor” (VEGF), que está sendo o foco da patogênese da DMRI exsudativa, e outros sugeridos como também envolvidos no processo como a angiopoetina e o “insulin-like growth factor-1” (IGF-1).^{24, 35}

Atualmente é enorme a quantidade de estudos e pesquisas sobre o assunto, e incessante a busca pela cura e combinações terapêuticas.³⁶⁻⁴² Uma medicina cada vez mais refinada e de qualidade, além dos melhoramentos

constantes dos medicamentos e antibióticos, associado a descobertas que proporcionam a prevenção como as vacinas por exemplo, acarretam no aumento da sobrevida, contudo, o tratamento perfeito da neovascularização ocular e doenças degenerativas ou senis ainda estão por vir.

1.3 A angiogênese ocular

Como a maioria das coisas na natureza, um equilíbrio deve ser atingido entre duas forças opostas para haver um produto final funcional. Angiogênese e antiangiogênese é um desses pares que deve atingir o equilíbrio. Em 1971, Judah Folkman introduziu a idéia de que o crescimento canceroso acontece a partir de células de tumores sólidos estimulando a uma resposta capilar de germinação, mais robusta do que a cicatrização de uma ferida ou inflamação comum. Na mesma linha de raciocínio, Folkman introduziu o conceito de antiangiogênese como controle e possível cura de alguns tumores.⁴³

A angiogênese ocular é importante causa de muitas doenças oculares e cegueira. Como descrito anteriormente, a angiogênese é definida pela formação de neovasos a partir de capilares pré-existentes. As doenças, assim como seus sinais e sintomas são bem conhecidos (Quadros 1 e 2). Contudo, os possíveis mediadores que corroboram no aparecimento dos neovasos e suas implicações no tratamento são diferentes em diferentes doenças. Dentre os principais fatores e/ou mediadores envolvidos no processo de angiogênese podemos citar o VEGF, GH , IGF1, entre outros.^{1, 21, 24}

Quando comparamos a neovascularização da retina e coróide de forma distinta, observamos que as doenças são diferentes, assim como, as suas causas. Dentre as principais doenças que causam neovascularização da retina podemos citar a retinopatia diabética proliferativa (RDP), OVCR, retinopatia falciforme proliferativa, retinopatia exsudativa familiar, sarcoidose, pars planitis, retinopatia por radiação, síndrome ocular isquêmica e doença Eales. Com relação as doenças que causam neovascularização coroideana a de maior destaque é a DMRI exsudativa; outras causas comuns são a miopia patológica, a ruptura de coróide, estrias angióides, síndrome da histoplasiose ocular,

coroidite multifocal, coroidopatia punctata e causas iatrogênicas como a fotocoagulação a LASER administrada de forma mais intensa.^{2, 44, 45}

Uma combinação de angiogênese e vasculogênese ocorre durante a neovascularização da retina. A teoria mais aceita se baseia na hipóxia como responsável pelo estímulo inicial para a liberação de fatores de crescimento, que resultam na proliferação e migração de células endoteliais. A hipóxia eleva no intra-celular o RNAm do VEGF nas células endoteliais da retina, células do EPR, pericitos, células de Müller e nas células ganglionares.⁴⁵⁻⁴⁷

Na neovascularização de coróide, apesar das alterações no fluxo sanguíneo que ocorre na DMRI, a hipóxia produzida não seria suficiente para induzir neovascularização. Como na neovascularização da retina, a neovascularização de coróide também é uma combinação de angiogênese e vasculogênese. Entretanto, acredita-se que o dano oxidativo e inflamação (e menos hipóxia) são responsáveis no desequilíbrio em favor de angiogênese.^{44, 45, 48, 49}

1.4 A abordagem Terapêutica Atual

Fotocoagulação a LASER

Laser, acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, é uma fonte que emite uma radiação luminosa coerente de potência variada que possibilita sua focalização com grande precisão. Atualmente a coagulação luminosa é um procedimento comum de tratamento e base terapêutica para diferentes doenças da retina.⁵⁰

O seu uso teve início em 1949 com Meyer-Schwickerath que utilizou a luz solar como fonte.¹⁷ Com o desenvolvimento das lâmpadas de alta pressão de Xenônio no início da década de 1950, ficou disponível poder suficiente para fotocoagulação do fundo do olho. Entretanto, somente uma década depois através de Maiman houve um rápido desenvolvimento da tecnologia do laser e o de Rubi foi o primeiro disponível.¹⁷ Alguns anos depois, em 1971, o laser de argônio foi o primeiro sistema comercializado na oftalmologia, e entre 1972 e 1975 o primeiro grande estudo (*Diabetic Retinopathy Study*) foi conduzido, demonstrando a eficácia do laser nos quadros de retinopatia diabética

proliferativa (RDP) reduzindo o risco de perda visual em 50%, tornando-se, desta forma, padrão ouro no tratamento da RDP até os dias de hoje.^{18, 19, 51, 52}

Corticosteróides

Os esteróides têm propriedades anti-inflamatórias e anti-angiogênicas e devido a essas propriedades se tornaram uma classe terapêutica de valor para os especialistas em retina. São usados no tratamento de várias doenças retinianas, incluindo os edemas maculares diabéticos e vaso oclusivos, DMRI úmida, edema macular cistóide secundário a facectomia e uveíte posterior.⁵³ Apesar de suas potenciais complicações como glaucoma e catarata, estudos recentes têm mostrado que os esteróides intra-vítreos podem ser usados como uma alternativa segura para a prática padrão da terapia a LASER no tratamento do edema macular secundário a diabetes ou trombooses vasculares.⁵⁴⁻⁵⁷

Os corticoesteróides mais utilizados nas doenças da retina são a dexametasona ou o acetato de triancinolona. O FDA aprovou o uso de esteróide intra-vítreo para restritas condições⁵³: Acetato de triancinolona sem conservantes (Triescence®, Alcon, Fort Worth-TX, EUA) é aprovado para o tratamento da oftalmia simpática, arterite temporal, inflamações oculares não infecciosas e para visualização do vítreo durante uma vitrectomia. O implante de dexametasona intra-vítrea (OZURDEX®, Allergan, Irvine-CA, EUA) é aprovado para o tratamento do edema macular secundário na oclusão de veia central da retina (OVCR) e na oclusão de ramo da veia central da retina (ORVCR). Fora destas indicações, embora usados rotineiramente na prática clínica para tratamento de uma gama de doenças oculares, são considerados "off label".

Acetato de triancinolona e dexametasona diferem na estrutura e potência e são selecionados principalmente com base na duração de ação. Seus efeitos se dão através da modulação de citocinas inflamatórias e efeitos anti-VEGF. Envolvem também estresse oxidativo e neuroproteção, que também são vias importantes que afetam a doença da retina.

A dexametasona é um potente agente anti-inflamatório que inibe várias citocinas inflamatórias. Tem meia vida curta (3,5 horas), mas é cinco vezes

mais potente que a triancinolona intra-vítrea. A apresentação da dexametasona é de 4 mg/ml de solução, e a maioria dos retinólogos injetam 0,4 mg no espaço vítreo. O implante de dexametasona intra-ocular (OZURDEX®) é inovador, biodegradável, contém 0,7 mg de dexametasona e permite a liberação sustentada e prolongada de corticosteróides na cavidade vítreo.⁵⁸ A dexametasona é predominantemente utilizada na prática clínica como terapia adjuvante no tratamento da DMRI ou edema macular secundário a OVCR ou ORVCR. Uma abordagem terapêutica tripla para DMRI exsudativa pode ser empregada quando métodos mais tradicionais falham. A terapia tripla consiste na terapia foto-dinâmica (PDT) com Verteporfina (Visudyne®, Novartis Pharmaceuticals Corp., East Hanover-NJ, EUA), o Bevacizumabe (Avastin®, Genentech, São Francisco-CA, EUA) ou Ranibizumabe (Lucentis®, Genentech, São Francisco-CA, EUA) e corticosteróides. Alguns estudos demonstraram que a terapia combinada (dupla ou tripla) pode reduzir a necessidade do número de injeções em alguns pacientes e estabilização da visão dos que não respondem à terapia individual com agentes anti-VEGF.⁵⁹⁻⁶³

O acetato de triancinolona tem uma meia vida intra-vítrea mais longa que a dexametasona, aproximadamente 18 dias. Kenalog® (40mg/ml) é a apresentação disponível mais comum e usualmente usada na dose de 4mg/0,1ml. Triescence® é semelhante ao Kenalog®, mas sem conservantes e aprovado pelo FDA para uso intra-ocular em determinadas condições.⁵³ No Brasil temos a disposição uma triancinolona sem conservantes, Ophtaac®, fabricada pela empresa Ophthalmos com sede no estado de São Paulo.

Alguns estudos tem apoiado o uso da triancinolona no tratamento de edema macular, embora, o LASER ainda seja considerado o padrão ouro. "The Diabetic Retinopathy Clinical Research Network" mostrou que não houve diferença significativa na acuidade visual em pacientes tratados com 1 mg, 4 mg de triancinolona intra-vítrea ou LASER focal/grid para edema macular diabético após um ano de tratamento. Dois anos depois do tratamento, entretanto, a acuidade visual e medidas de espessura macular foram melhores no grupo tratados com LASER. Além disso, 33% dos pacientes que receberam 4mg de triancinolona intra-vítrea tiveram um aumento da pressão intra-ocular da linha de base de 10 mmHg, em comparação com 16% dos pacientes no grupo 1mg, e 4% dos pacientes no grupo do LASER.⁵⁴⁻⁵⁶

Esteróides intra-vítreos muitas vezes diminuem o edema macular permitindo a utilização de uma potência de LASER mais baixa no tratamento. Os esteróides têm um efeito mais duradouro do que os agentes anti-VEGF e tratam também o componente inflamatório em pacientes que apresentam freqüentemente co-morbidades isquêmicas. Entretanto, devido as complicações conferidas aos corticóides, é necessário mais pesquisas na tentativa de evolução da sua eficácia e diminuição dos efeitos colaterais.

Terapia foto-dinâmica (PDT)

Com foco na DMRI úmida e seu tratamento seletivo, outrora utilizava-se a fotocoagulação com LASER térmico para destruição das membranas neovasculares subretinianas (MNSR) ou cirurgia, aconteceu o desenvolvimento e introdução de nova modalidade terapêutica no final da década de 1990. Diferentemente do LASER convencional altamente destrutivo e não seletivo, através de um contraste venoso (Verteporfina – Visudyne®, Novartis Ophthalmics, Suíça) e de um LASER específico era possível a ablação mecânica das membranas de forma seletiva, pois o LASER é absorvido pelo contraste presente na lesão patológica não havendo destruição de retina saudável adjacente. O PDT foi liberado pelo FDA para tratamento de formas neovasculares da DMRI e neovascularização de coróide secundária a miopia patológica baseado em 2 grandes estudos: o estudo TAP (Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy) e o VIP (Verteporfin in Photodynamic Therapy Studies).⁶⁴⁻⁶⁷

A principal vantagem do PDT é a sua seletividade preservando estruturas neuroretinianas adjacentes ao componente neovascular. O PDT é realizado em 2 fases, a primeira composta pela injeção via venosa do contraste fotosensível, a segunda após dez minutos consiste em aplicação do LASER. Os parâmetros originais são: dosagem do Visudyne® de 6 mg/cm² de área de superfície corporal, LASER de diodo de 689 nm de onda, dose de luz de 50 J/cm² com irradiação de 600 mW/cm² em 83 segundos.⁶⁷ Há autores que defendem atualmente um PDT de fluência reduzida, reduzindo o tempo de exposição, a potência ou o volume de contraste injetado.⁶⁸⁻⁷²

Com o transcorrer do tempo, foi observado indicações *off-label* do PDT para outras patologias tais como: proliferação angiomas retiniana (RAP), descolamento do epitélio pigmentado da retina (DEP), vasculopatia coroideana polipoidal, uveítes inflamatórias, neovascularização de coróide idiopática, estrias angioides, corioretinopatia serosa central, telangiectasias parafoveais, hemangioma de coróide, doença de von Hippel-Lindau, melanomas, carcinomas, tumores vasoproliferativos e até as retinopatias diabéticas.⁷³⁻⁸⁶

Terapia anti-angiogênica

Desde 1948 foi lançada na oftalmologia a busca pela cura da neovascularização ocular patológica após o conceito proposto por Isaac Michaelson sobre a existência de um fator “X”, responsável pelas alterações irianas e retinianas no olho diabético. Em 1983 foi realizada a identificação deste fator “X”, sendo seis anos mais tarde isolado, purificado e denominado VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Na DMRI a descrição do envolvimento de fatores de crescimento para neovasos retinianos e coroideanos serviu de estímulo à pesquisa e utilização de novas drogas.⁸⁷⁻⁹⁶

O VEGF é um potente indutor da inflamação e permeabilidade vascular sendo 50.000 vezes mais potente que a histamina a título de comparação. O aumento da permeabilidade e o conseqüente extravasamento vascular é a principal causa da baixa visual nas neovascularizações oculares patológicas.⁹⁷⁻

100

A família do VEGF inclui o *Placenta Growth Factor* (PlGF) e os VEGF-A, B, C, D e E. O VEGF-A, classicamente conhecido como VEGF, é o mais estudado. O VEGF-A é uma proteína glicosilada dimérica de 36 a 46 kD, fica localizado no cromossomo 6 apresentando algumas isoformas, sendo as mais importantes: VEGF-A 121, 165 e 189, que, por sua vez agem sobre os receptores VEGFR-1 e R2.¹⁰⁰⁻¹⁰³

O VEGF é o ator principal na neovascularização ocular. A cascata angiogênica pode ser quebrada em pelo menos 3 vias: a primeira via já disponível atualmente seria o bloqueio direto da proteína utilizando drogas já aprovadas (Lucentis®, Macugen®, ou Avastin® - de uso *off-label*); a segunda via se baseia na inibição do RNA mensageiro por técnica de interferência de

RNA ou silenciador de RNA (siRNA); e a terceira via é bloquear os receptores, principalmente o VEGFR1 e R2, através de uma proteína de fusão (VEGF-Trap). As duas últimas vias citadas estão sendo testadas e comparadas com as drogas já liberadas.

Pegaptanibe sódico (Macugen®)

Em dezembro de 2004, o pegaptanibe sódico (Macugen®, Eyetech, Nova York, NY, EUA) tornou-se o primeiro anti VEGF a ser aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA). A droga é um aptâmero (do Latim aptus [encaixar ou ajustar] e do Grego meros [parte ou região]) de RNA que se liga seletivamente apenas a isoforma VEGF₁₆₅. O pegaptanibe é único entre os agentes anti-VEGF que impede o VEGF₁₆₅ e suas isoformas maiores de se ligar aos receptores de VEGF. Ele não liga VEGF₁₂₁ ou bioativos e fragmentos proteolíticos do VEGF₁₆₅¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

O estudo, *VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization* (VISION)¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, foi o responsável por demonstrar a eficácia do Macugen, onde pacientes com DMRI exudativa receberam uma das três doses de pegaptanib intravítreo ou injeções placebo a cada 6 semanas durante 48 semanas. No grupo tratado com pegaptanibe, 70% dos pacientes perderam menos de 15 letras em comparação com 55% dos pacientes do grupo placebo em 12 meses (P <0,001). Enquanto o tratamento com o pegaptanibe parecia seguro, sérias complicações oculares tais como endoftalmite (1,3% dos pacientes), lesão traumática do cristalino (0,7% dos doentes) e descolamento de retina (0,6% dos doentes), foram relatadas. Entretanto, foi demonstrado a segurança e eficácia do Macugen sendo o primeiro anti VEGF liberado para o tratamento da DMRI neovascular no mundo.¹¹⁰ O Macugen, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2006 no Brasil, amplamente utilizado, apesar do seu alto custo. Contudo, com o advento de drogas anti VEGFs mais eficazes, praticamente não é mais indicado.

Bevacizumabe (Avastin®)

O Bevacizumabe (Genentech, São Francisco-CA, EUA; distribuído no Brasil pela Roche) foi o primeiro anti-VEGF liberado pelo FDA¹¹¹ – fevereiro de

2004. Inicialmente foi aprovado para o tratamento de câncer colorretal metastático no uso combinado com a quimioterapia. No presente, o Bevacizumabe é amplamente utilizado em diversos países como medicação de uso *off-label* para tratar doenças oculares incluindo a DMRI exsudativa, RD, oclusões vasculares, miopia patológica, doenças da córnea, glaucoma neovascular, entre outras. Michels *et al* foram os primeiros a reportarem os achados em pacientes tratados sistemicamente com o Bevacizumabe (SANA *trial*).¹¹² A eficácia e segurança de injeções intra-vítreas repetidas já foi explorada experimentalmente e clinicamente, no entanto, efeitos adversos após o uso intra-ocular do Bevacizumabe são raros, mas existem.^{106, 112, 113}

O Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, produzido por tecnologia de DNA recombinante em um sistema de expressão de célula de mamífero, mais precisamente, ovário de hamster chinês, em meio nutriente contendo antibiótico gentamicina.¹¹⁴ O composto se liga e neutraliza seletivamente a atividade biológica do VEGF humano. O Bevacizumabe, que é um anticorpo inteiro, tem dois domínios de ligação de antígeno, enquanto o Ranibizumabe (Lucentis®), que é uma fração de anticorpo, apenas um (Figura 01). O Bevacizumabe é constituído por 214 aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 149.000 Daltons. Isso reflete ao Bevacizumabe uma maior meia vida sistêmica (17 a 21 dias no vítreo) e uma menor penetração na retina por apresentar uma molécula maior em comparação ao Ranibizumabe.¹¹⁵⁻¹²¹

Recentes estudos têm explorado a farmacocinética do Bevacizumabe no olho humano. O trabalho publicado por Sawada *et al.* apresentou redução de dez vezes na concentração do VEGF intra-ocular nos 18 olhos com retinopatia diabética proliferativa que receberam 1,25mg de Bevacizumabe intra-vítrea.¹²² Outra série de 30 olhos com edema macular secundário a DMRI, RD ou oclusão venosa da retina, concluiu que a meia-vida do Bevacizumabe foi de 9,82 dias.¹²²

Até o momento, evidências sobre a eficácia do Bevacizumabe são baseadas em dados empíricos e não controlados. Estudos não controlados sugerem a eficácia do Bevacizumabe na DMRI exsudativa e em outras neovascularizações oculares. Enquanto alguns pacientes experimentaram ligeira elevação da pressão arterial ou nenhum efeito adverso grave ocular e/ou

sistêmico, novas publicações afirmam maiores taxas de infarto do miocárdio e morte naqueles que usaram o Bevacizumabe em comparação ao Ranibizumabe.^{112, 113, 123, 124}

O “National Eye Institute”, importante órgão de pesquisa oftalmológica sediado nos EUA, promove o estudo CATT (*Comparison of AMD Treatments Trial*), um estudo randomizado, duplo-cego, já em fase III, desenhado para comparar diretamente o Bevacizumabe e Ranibizumabe e avaliar a segurança e eficácia do Avastin®, utilizando tanto dosagens fixas a cada 4 semanas ou variáveis divididos em 4 grupos, sendo 2 grupos de cada droga. Os resultados do CATT vão responder várias dúvidas sobre ambas as medicações.¹²⁵

Ranibizumabe (Lucentis®)

O Ranibizumabe (Lucentis®, Genentech, São Francisco-CA, EUA) foi aprovado pelo FDA em 30 de junho de 2006 para o tratamento da DMRI neovascular. Foi desenvolvido a partir do Bevacizumabe para uso ocular intra-vítreo, peso molecular 3 vezes menor que a molécula mãe para melhor penetração retiniana e com alta afinidade de ligação ao VEGF-A. Ranibizumabe é um fragmento Fab, composto quimérico, de anticorpo monoclonal recombinante humano e de camundongo. A seqüência humana o torna menos antigênico em primatas. O Ranibizumabe inibe todas as isoformas do VEGF-A e bloqueia sua ligação a seus receptores.^{91, 127-129}

O Ranibizumabe é uma versão humanizada do fragmento Fab do mesmo anticorpo monoclonal do camundongo do Bevacizumabe. Entretanto sua afinidade e poder de ligação para com o VEGF-A foi amadurecida e amplificada em aproximadamente 10 vezes quando comparado ao Bevacizumabe. É produzido em um sistema de expressão de *Escherichia coli* sem a glicosilação da proteína. Ranibizumabe foi a primeira terapia para DMRI neovascular a estacionar o processo ativo da membrana neovascular e melhorar significativamente a acuidade visual em todos os subtipos de lesão.^{114, 130-132}

Trabalho anterior, às pesquisas com o Ranibizumabe, com injeção intra-vítrea de Trastuzumabe (Herceptin®, Genentech, São Francisco-CA, EUA) de 1999, demonstrou diferenças de penetração retiniana do anticorpo de corpo inteiro e sua forma Fab. Apenas o fragmento (forma Fab) do Trastuzumabe

conseguiu total penetração na retina.¹³³ Por conta das camadas plexiformes interna e externa acredita-se haver uma barreira natural que impede a passagem de moléculas de aproximadamente 76,5 kD e maiores até a região coroideana.¹³⁴

Dada a localização subretiniana na DMRI úmida, e intraretiniana em outras patologias tais como na diabete e trombose vasculares, um composto que alcance total penetração da retina parece oferecer melhores respostas.¹⁰⁶

Em macacos, a administração intra-vítrea do Ranibizumabe apresentou uma rápida distribuição em toda a retina, meia-vida no vítreo de três dias e mínima exposição sistêmica.¹³⁵ Níveis sistêmicos muito baixos de Ranibizumabe circulante foram encontrados em humanos após a injeção intra-vítrea.¹³⁶ Em outro estudo com cobaias com membrana neovascular subretiniana induzida por LASER houve diminuição da neovascularização da retina e da permeabilidade vascular com a administração intra-vítrea de Ranibizumabe.⁹¹

Vários estudos têm comprovado a eficácia do Ranibizumabe no tratamento da DMRI neovascular. Entre eles, podemos citar o MARINA e o ANCHOR, ambos estudos são ensaios clínicos controlados, randomizados, e duplo-cegos.¹³⁰⁻¹³² Os pacientes foram tratados com doses de 0,3 ou 0,5mg de Ranibizumabe intra-vítrea ou injeções placebo no estudo MARINA, enquanto no ANCHOR foi testado Ranibizumabe intra-vítreo e PDT com verteporfina placebo contra a injeção fictícia de Lucentis® e PDT com verteporfina no outro grupo.

Após um ano de tratamento em ambos os estudos, 95-96% dos doentes tratados com 0,5mg Ranibizumabe experimentaram melhora ou estabilização da visão, em comparação com 62% dos doentes tratados com injeções placebo ($P < 0,001$) e 64% dos pacientes tratados com PDT utilizando verteporfina ($P < 0,001$). Esta disparidade de resultados manteve-se estável após 24 meses. Por fim, não foram observados efeitos oculares ou sistêmicos graves, o que se leva a crer na segurança da droga em questão.¹³⁰⁻¹³²

Além da indicação do uso na DMRI exsudativa o Ranibizumabe está sendo avaliado para uso em RD (estudo RESTORE) e já foi liberado pelo FDA como adjuvante no tratamento das oclusões vasculares de ramo de veia central de retina (estudo BRAVO).

No estudo BRAVO, foram avaliados pacientes com edema macular secundário a oclusão de ramo de veia central da retina (ORVCR) em três grupos distintos; Ranibizumabe intra-vítreo de 0,3mg e 0,5mg, além de placebo. Com relação a acuidade visual houve uma melhora média de 16,6 letras no grupo de 0,3mg, 18,3 para o de 0,5mg de Lucentis® e de apenas 7,3 letras no grupo placebo após 6 meses de tratamento. A porcentagem de pacientes que ganharam 15 letras ou mais foi de 55.2% (0,3 mg), 61.1% (0,5 mg) e 28.8% no grupo placebo ($P < 0,0001$ para cada grupo do Ranibizumabe versus grupo placebo). A redução percentual média da espessura foveal em excesso, medida através da tomografia de coerência óptica (OCT) em seis meses foi de 97,0%, 97,6% e 27,9% nos grupos de 0,3mg, 0,5mg e placebo respectivamente. Maior quantidade de pacientes do grupo placebo (54,5%) necessitaram receber o tratamento com LASER complementar em comparação com os grupos de Ranibizumabe de 0,3mg (18,7%) e 0,5mg (19,8%). A segurança foi consistente com estudos anteriores, não havendo relatos de incidentes. Concluiu-se então que o Lucentis® foi efetivo e seguro no tratamento dos casos de ORVCR com edema macular.¹³⁷

O estudo RESTORE, recentemente publicado, teve por objetivo demonstrar a superioridade do tratamento de pacientes diabéticos portadores de edema macular através da monoterapia com Ranibizumabe 0,5mg intra-vítreo ou em combinação com LASER convencional comparando com o tratamento exclusivo com LASER – considerado ainda tratamento padrão ouro. O trabalho é baseado na variação média da acuidade visual com correção ao longo de 12 meses. Foram incluídos 345 pacientes diabéticos tipo I e II com baixa visual secundária a edema macular. Os pacientes foram randomizados em 3 grupos: grupo 1 (Ranibizumabe mais LASER placebo), grupo II (Ranibizumabe mais LASER) e grupo III (injeção intra-vítrea placebo mais LASER). Foi demonstrado como resultado final que a monoterapia com Ranibizumabe ou em combinação com laser proporcionou ganho de acuidade visual superior estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado com LASER apenas.¹³⁸

1.5 Abordagem Terapêutica Futura

VEGF-trap

VEGF-trap (Regeneron, Tarrytown-NY, EUA) é uma proteína solúvel, de fusão resultante da combinação de elementos ligantes dos domínios extracelulares dos receptores R1 e R2 do VEGF e a região constante Fc da imunoglobulina G1 (IgG1). A molécula VEGF-trap evoluiu durante seu desenvolvimento (antes era carregada positivamente e além de sua afinidade com o VEGF-A se ligava, não especificamente com a matriz extracelular) sendo modificada para aumentar a sua afinidade com o VEGF-A resultando em propriedades farmacocinéticas mais atraentes em um contexto clínico. O VEGF-trap apresenta enorme afinidade a todas as isoformas do VEGF-A e também ao PlGF, o que permite teoricamente utilizar concentrações mais baixas e com duração de ação mais longas podendo levar a um menor número de injeções. A porção Fc da imunoglobulina G1 confere a proteína propriedades próximas à de um anticorpo reduzindo sua eliminação e aumentando a meia-vida.¹³⁹⁻¹⁴¹

Poucos estudos sobre o VEGF-trap foram completados até o momento, a grande maioria estão acontecendo no presente nos EUA, e necessita-se obter respostas sobre a sua real segurança e tolerabilidade no uso intra-ocular, além de o comparar com drogas já aprovadas.

Radiação

O tratamento da neovascularização ocular, principalmente na DMRI, utilizando radiação ionizante são sugeridos há quase 20 anos como provável alternativa aos tratamentos atuais para as doenças neovasculares da retina.¹⁴²⁻¹⁴⁵ A radiação ionizante age causando quebras da fita dupla do DNA, dificultando assim a replicação de células endoteliais vasculares dentro do complexo neovascular da coróide. Após a aplicação de uma baixa dose de radiação, células endoteliais vasculares demonstram alterações morfológicas e genéticas, inibição da replicação, aumento da permeabilidade celular, e apoptose.¹⁴⁶⁻¹⁵¹

Grande parte da literatura publicada com uso de radiação ionizante no tratamento da DMRI exudativa as descreve aplicando a radiação do exterior

para o interior do olho. Provavelmente as doses utilizadas são mais altas do que a necessária para o tratamento das lesões intra-oculares.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Ávila *et al.* propuseram o uso de um dispositivo intra-ocular de aplicação de estrôncio-90 para permitir a entrega focal de radiação beta diretamente na lesão neovascular da coróide, minimizando a quantidade de radiação recebida por estruturas vizinhas e na retina saudável, através de vitrectomia via pars plana prévia.^{143, 144}

Tem sido postulado que a terapia combinada de radiação ionizante associada com agentes antiangiogênicos pode promover outro potencial para tratar a doença neovascular ocular. Recentes descobertas no câncer apoiam esta teoria. Parece haver sinergia positiva no uso em conjunto das duas modalidades.^{144, 155, 156} No entanto, mais estudos devem ser realizados em um maior número de pacientes a fim de determinar o uso da radiação de forma segura e eficaz.

Sirolimus

Sirolimus, também conhecido como Rapamicina, é um macrolídeo que tem sido amplamente utilizado sistematicamente como um agente imunossupressor e para a prevenção de estenoses em *stents* coronários após a angioplastia. Sua estrutura é similar a outros imunossupressores como a Ciclosporina e FK-506 ou Tracolumus. O Sirolimus, apresenta propriedades físicas que fazem dele um candidato promissor para futura droga de uso ocular, pois possui uma molécula pequena e altamente lipofílica.¹⁵⁷⁻¹⁶¹

O alvo da rapamicina em mamíferos, ou mTOR é uma proteína quinase que regula o crescimento celular e metabolismo em resposta a mudanças no ambiente, tais como a disponibilidade de nutrientes ou a presença de fatores de crescimento. Sirolimus foi originalmente identificado por causa de suas propriedades anti-fúngicas, mas logo foi identificado suas propriedades imunossupressoras e anti-neoplásicas através de sua ligação e inibição da mTOR.^{162, 163}

O Sirolimus apresentou ampla atividade em testes *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a expressão de vários genes relacionados à inflamação. Inibe a migração induzida pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). É

anti-fibrótico, diminuindo a proliferação dos fibroblastos induzida por PDGF e pelo fator de crescimento de fibroblasto básico em culturas de cápsula de Tenon humana. É anti-proliferativo, bloqueando fatores de crescimento, hipóxia responsivos como o fator de crescimento fibroblástico. E, finalmente, tem poder anti-angiogênico, reduzindo o VEGF (principalmente VEGF-A) e outros fatores.¹⁶²⁻¹⁶⁶

Foi aprovado pelo FDA em 1999 para a prevenção da rejeição do transplante e em 2003 para uso em *stents* coronários. Tem sido amplamente utilizada em cardiologia para evitar a reestenose, e há semelhanças entre os processos de aterosclerose coronariana e neovascularização de coróide. Ambos envolvem proliferação endotelial e fibrose em resposta às citocinas.¹⁶⁷

Os efeitos colaterais da sua administração sistêmica incluem aumento dos lipídios, diminuição da hemoglobina, artralgia, edema periférico, queixas gastrointestinais, transtornos da pele, distúrbios eletrolíticos, infecções e até pneumonia intersticial potencialmente fatal.^{106, 168}

Em estudos pré-clínicos, o Sirolimus demonstrou ser eficaz em modelo animal de neovascularização de coróide. A combinação de atividades (imunossupressoras, antiangiogênicas e antiproliferativa) o torna uma droga promissora para uso como agente terapêutico no tratamento de doenças neovasculares do olho.¹⁶⁹

Infliximabe, Daclizumabe e o Sirolimus estão sendo investigados, atualmente em fase 1 de ensaios clínicos, como um potencial agente terapêutico para o tratamento de neovascularização de coróide e edema macular diabético. A atual fase do estudo de Sirolimus para aplicações oftálmicas objetiva-se em demonstrar a capacidade de eficácia e segurança da administração da droga para os tecidos oculares. Estão sendo testadas as vias: intra-vítrea e subconjuntival.¹⁷⁰

Small Interfering RNA (siRNA) Silenciador de RNA (siRNA)

Na célula a proteína é codificada por um RNA específico, este RNA é chamado de RNA mensageiro (RNAm). O RNA traduz a proteína e assegura a expressão genética carregada. O RNA é uma macromolécula e definida por sua sequência de nucleotídeos. A interferência do RNA é um processo comum

a todas as células e corresponde a um mecanismo natural de defesa como acontece nas viroses. A terapia baseada na interferência do RNA bloqueia a produção de produtos específicos da proteína através da degradação seletiva do RNAm silenciando seus genes. Na DMRI é possível produzir um siRNA (silenciador de RNA) para degradar o RNAm que codifica diretamente o VEGF-A. Esta degradação iria impedir a secreção do VEGF, no entanto, não teria ação sobre o VEGF já em circulação.^{171, 172}

Vários agentes que empregam tecnologia siRNA estão atualmente em desenvolvimento. Em estudos pré-clínicos, Bevasiranibe (Opko Inc., Miami-FL, EUA) reduziu significativamente a produção de VEGF-A em resposta à hipoxia in vitro e in vivo através do RNAm do próprio VEGF-A. Outra abordagem que está sendo testada é contra o silenciamento do RNAm do receptor do VEGF (VEGFR1) (AGN211745 ou antigo siRNA-027, Allergan, Irvine-CA, EUA). Tanto in vitro quanto in vivo o composto demonstrou uma redução nos níveis do VEGFR1.¹⁷³

No estudo COBALT (*Combining Bevasiranib and Ranibizumab Therapy*) os pacientes serão divididos em 3 grupos: aqueles que recebem Bevasiranibe a cada 8 ou 12 semanas e um grupo controle que recebe Ranibizumabe a cada 4 semanas. Todos os pacientes receberão Ranibizumabe no início do estudo, na semana 4 e 8, antes de iniciar seu próprio regime de tratamento na semana 12. Além disso, os indivíduos incluídos nos grupos do Bevasiranibe irão receber duas doses de siRNA na semana 2 e 6.¹⁰⁶

Foi verificado também, segurança e boa tolerabilidade em dados preliminares de ensaio clínico com AGN211745 na dosagem entre 100 a 1600µg em 26 pacientes com DMRI. Estudo randomizado, duplo-cego, fase II, teve início para comparar a administração mensal de AGN211745 e Ranibizumabe em doses mensais.¹⁰⁶

Análogos da somatostatina

Apesar do rápido desenvolvimento das modalidades terapêuticas farmacológicas e cirúrgicas, o tratamento das doenças da retina comumente resultam numa pobre acuidade visual. O mecanismo patológico primário que corrobora com a baixa visão é a morte celular. A perda celular da retina é

induzida por uma variedade de estímulos, incluindo isquemia, inflamação e estresse oxidativo. É necessário o desenvolvimento de drogas, não apenas para tratar a doença já instalada, mas sim com o objetivo de prevenir o seu desenvolvimento.¹⁷⁴

Novas estratégias neuroprotetoras vêm sendo avaliadas para a prevenção da morte das células retinianas, mas existe ainda a necessidade de agentes farmacológicos eficazes e ausência de efeitos adversos. Estes novos fármacos poderiam ser empregados isoladamente ou em associações terapêuticas no tratamento de doenças específicas. O neuropeptídeo somatostatina, em especial o seu receptor análogo sst2 seletivo, mostra capacidade de inibir a neovascularização induzida por isquemia em modelos de isquemia da retina protegendo o tecido contra a morte celular.¹⁷⁴

A somatostatina e seus análogos sintéticos, o principal deles é a Octreotida (Sandostatin®), apresentam propriedades antiangiogênicas, protegem a retina contra isquemia e inibem a proliferação das células endoteliais e células do epitélio pigmentado da retina (EPR). A isquemia influencia o crescimento vascular, a fisiologia e a viabilidade das células do EPR e retinianas.¹⁷⁵⁻¹⁸²

Somatostatina (*somatotropin-release inhibitory factor*) é um tetradecapeptídeo que foi isolado de extratos do hipotálamo e regula a secreção do hormônio do crescimento (GH). Esse neuropeptídeo também é produzido em outros órgãos tais como: hipófise, intestino, glândulas exócrinas e endócrinas e na retina. A somatostatina pode estar presente em diversas células e tem a capacidade de afetar a secreção hormonal, neurotransmissão, proliferação celular, estabilização de membranas e a inflamação. O análogo sintético, Octreotida, é um potente e específico agonista do receptor tipo 2 (sst2) sendo 45 vezes mais forte, em termos de inibição de secreção de crescimento que a somatostatina natural.^{175, 183-185}

A ação clássica da somatostatina é inibir o GH. O GH é principalmente produzido na glândula pituitária anterior resultando em síntese de IGF-1 (*Insulin Growth Factor – 1*). O IGF-1 estimula a secreção de somatostatina e inibe a secreção de GH. A somatostatina se faz presente no vítreo e nos pacientes diabéticos, como já foi reportado, o seu nível é reduzido.^{184, 186}

No seu uso original, via subcutânea, o Sandostatin® por conta de sua ação inibitória do GH, glucagon e na liberação da insulina, afeta a regulação da glicose. A Octreotida leva a uma redução da glicemia em pacientes insulino dependentes, que vão requerer menos doses para o controle. A redução do uso da insulina pode chegar a 25 – 50%. Originalmente desenvolvida para tratar pacientes com acromegalia, a sua aplicação na oftalmologia e em outras doenças endócrinas parece bastante promissora. Porém, efeitos adversos existem e os mais comuns vão desde reações no local da aplicação até diarreia e dores abdominais, hipotireoidismo e cálculos biliares são mais raros.¹⁸⁷

A somatostatina, GH e IGF-1 possuem papel importante na manifestação e progressão da retinopatia diabética e outras neovascularizações relacionadas a isquemia. A hipóxia da retina acarreta o aumento intraocular da síntese de IGF-1 e VEGF. Quanto mais proliferativa for a retinopatia maiores são os níveis desses fatores de crescimento, entretanto, em pacientes submetidos a vitrectomia e fotocoagulação a LASER os níveis de VEGF são reduzidos e os do IGF-1 não, indicando que o envolvimento do eixo somatostatina, GH e IGF-1 é bastante relevante, principalmente em casos avançados e onde tratamentos prévios com LASER falharam.^{188, 189}

1.6 Justificativa da Investigação

Considerando, portanto, que a neovascularização retiniana é causa importante de baixa visual severa em doenças de grande prevalência e impacto social nos idosos por DMRI, diabéticos por RD, hipertensos por oclusões vasculares, em prematuros por ROP, e um dos grandes problemas de saúde pública emergentes na atualidade, impõe-se a busca de tratamentos alternativos que sejam compatíveis com a manutenção de boa acuidade visual e de baixo custo para nossa população.

Analisando o fato da presença dos fatores angiogênicos (VEGF, GH e IGF-1) na coróide, retina e vítreo, e o uso na atualidade de apenas anti-angiogênicos que bloqueiam somente o VEGF, estudos clínicos e experimentais sugerem o envolvimento do GH e IGF-1 nos processos de neovascularização da retina, secundários a RD, ROP e DMRI.¹⁹⁰

O octreotida (Sandostatin[®], Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça), provavelmente, pode ser útil no tratamento de neovascularização retiniana por DMRI, RD e ROP, tanto como droga única bloqueando o GH e IGF-1, como associado a outras drogas que bloqueiam o VEGF.

1.7 Octreotida (Sandostatin[®])

O octreotida é um derivado octapeptídeo sintético da somatostatina administrado por via subcutânea. A droga contém os aminoácidos essenciais para a ligação ao receptor celular da somatostatina.¹⁹¹ A redução do tamanho e a estabilização do peptídeo contra o ataque enzimático resultaram em uma estrutura biologicamente mais estável, com atividade intrinsecamente semelhante à da somatostatina. Em comparação à meia-vida de 2 a 3 minutos da somatostatina, o octreotida tem uma meia-vida plasmática de aproximadamente 1,5 h em humanos e a descontinuação não resulta em hipersecreção de rebote.^{191, 192} Além disso, a droga inibe seletivamente a secreção de GH, o que se pode constatar pela maior inibição da secreção desse hormônio em comparação à secreção de insulina ou glucagon.¹⁹³

No tratamento da acromegalia, o acetato de octreotida demonstrou reduzir com rapidez e eficácia a hipersecreção de GH e as concentrações de IGF-1 circulante.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

1.8 A Retina Humana

O conhecimento das formas, das relações entre tecidos e da micro-estrutura dos olhos facilita o entendimento das complexas funções oculares e abre caminho para compreender os mecanismos das doenças, a forma de ação de medicamentos e os métodos cirúrgicos.¹⁹⁷

O olho humano, com diâmetro médio de 23,5mm no adulto, pode ser descrito em três camadas. A camada externa composta pela córnea e esclera. A média ou úvea composta pela íris e corpo ciliar que produz humor aquoso e dá suporte ao cristalino; e a camada interna composta pela retina e coróide (Figura 01).¹⁹⁷

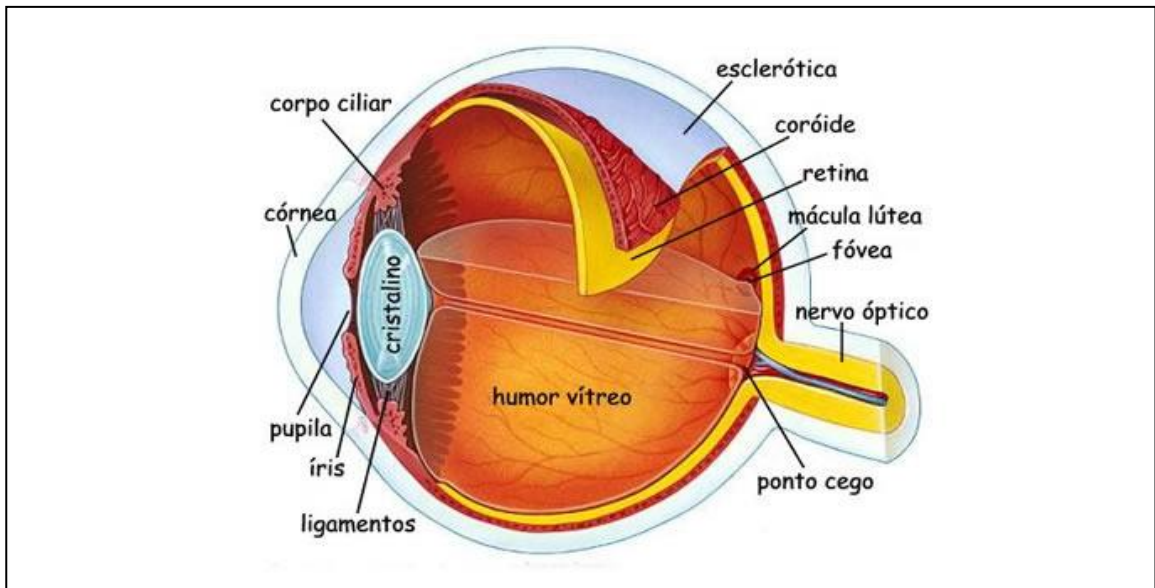


Figura 01: Desenho esquemático do olho humano. Disponível em: <<http://www.saberebomdemais.com>> Acesso em: 10/04/2011.

A retina, fina e delicada camada de tecido nervoso, é o estrato neurossensorial do olho, com uma área de superfície de cerca de 270mm². Tem uma espessura de 0,56mm próximo ao nervo óptico reduzindo para 0,18mm na região do equador e 0,1mm na ora serrata.¹⁹⁸ É responsável pela transdução do estímulo visual (luminoso) em elétrico (neuronal). Representa a túnica íntima, localizando-se internamente a coróide e externamente ao corpo vítreo. Macroscopicamente, ela divide-se em retina periférica (Figura 02) e retina central ou pólo posterior.

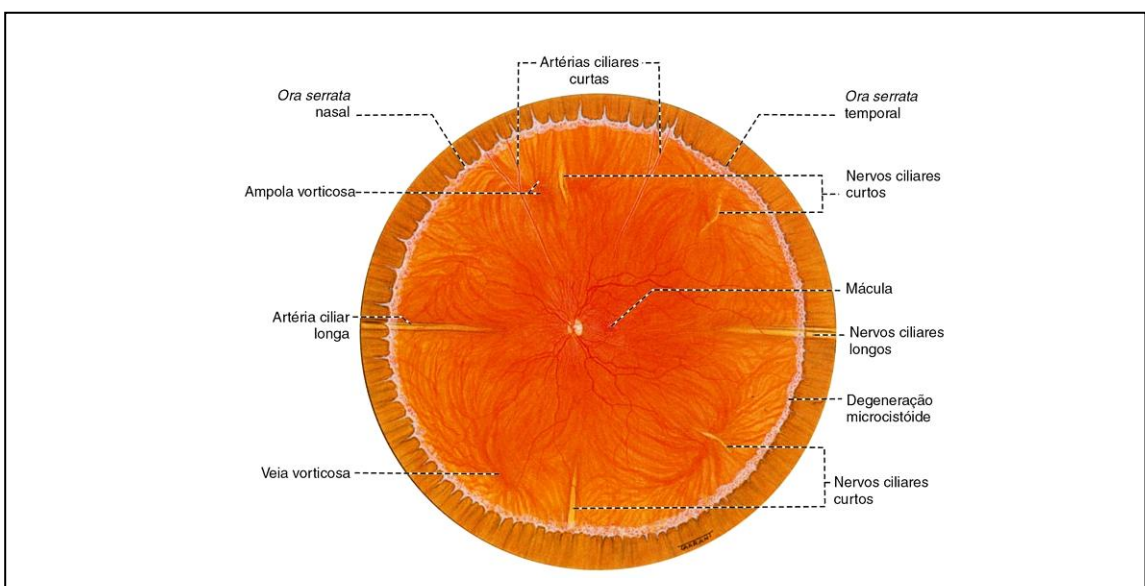


Figura 02: Desenho esquemático da retina humana. Reproduzido de KANSKI, Jack J. *Oftalmologia Clínica, uma abordagem sistemática* 5^a edição 2004.¹⁹⁹

Microscopicamente, a retina possui suas células distribuídas em dez camadas²⁰⁰ (Figura 03). Da região mais externa (próxima a coróide) para a mais interna (próxima ao corpo vítreo), são elas:

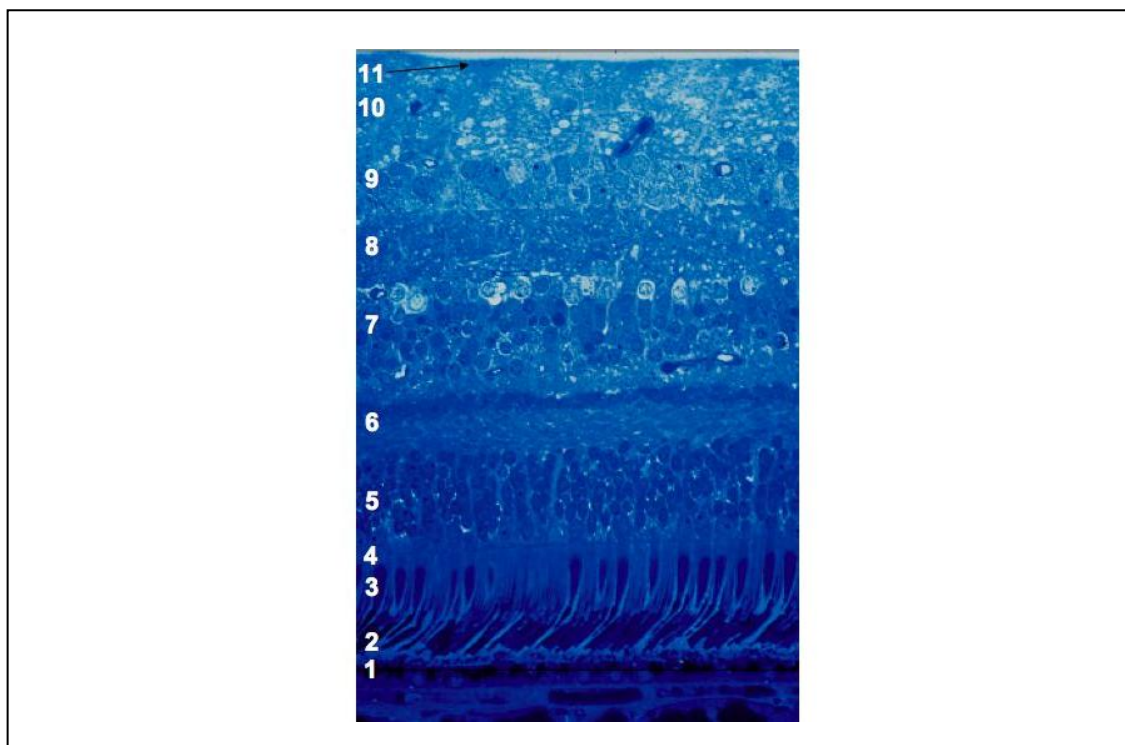


Figura 03: Corte histológico da retina de olho humano. 1=EPR (Epitélio Pigmentado da Retina); 2 e 3=FR (Camada de Fotorreceptores Segmento Interno e Externo respectivamente); 4=MLE (Membrana Limitante Externa); 5=CNE (Camada Nuclear Externa); 6=CPE (Camada Plexiforme Externa); 7=CNI (Camada Nuclear Interna); 8=CPI (Camada Plexiforme Interna); 9=CCG (Camada de Células Ganglionares); 10=CFN (Camada de Fibras Nervosas); 11=MLI (Membrana Limitante Interna). Reproduzido e adaptado de Spalton *et al.* Atlas de Oftalmologia Clínica 3ª edição 2005.²⁰¹

1. Epitélio Pigmentado da Retina (EPR) – camada monocelular, com formato cuboidal, formada por células pigmentadas que apresentam íntimo contato com o segmento externo dos fotorreceptores. Estende-se do nervo óptico à ora serrata e continua anteriormente como camada pigmentada do epitélio ciliar. Tem como função o transporte de nutrientes e metabólitos, a absorção da luz refletida pelos grânulos, a elaboração da matriz extracelular, a renovação dos fotorreceptores e o transporte e esterificação da vitamina A.¹⁹⁷
2. Camada de Fotorreceptores (FR) – É dividida em duas porções: segmento interno e segmento externo.¹⁹⁷ Os segmentos externos dos fotorreceptores são responsáveis pela captação dos estímulos luminosos e sua transdução elétrica. Os FR são considerados o primeiro neurônio das vias ópticas e dividem-se em dois tipos: cones e bastonetes.

3. Membrana Limitante Externa (MLE): Delgada membrana constituída por zônulas de adesão entre as células de Müller e entre elas e os fotorreceptores.¹⁹⁷ Sua provável função é regular o meio extracelular dos FR, assim como manter o alinhamento preciso dos cones e bastonetes.¹⁹⁸ As células de Müller são as maiores células da retina e junto com as outras células gliais, constituem as células do tecido conectivo da retina.¹⁹⁷
4. Camada Nuclear Externa (CNE): Contêm os segmentos internos dos FR, os núcleos. Sua espessura varia de quatro camadas de núcleos em toda a periferia a dez camadas de núcleos na fóvea.¹⁹⁷
5. Camada Plexiforme Externa (CPE): Região de sinapses entre os neurônios de primeira e segunda ordem da retina (FR, células amácrinas, horizontais e bipolares). As células bipolares são os neurônios de segunda ordem e seguem uma orientação radial na retina; as horizontais formam uma rede de fibras que integram a atividade dos FR horizontalmente e sua concentração decresce da fóvea para a periferia.¹⁹⁷
6. Camada Nuclear Interna (CNI): Composta de 8 a 12 fileiras de núcleos, dispostos em 4 camadas distinguíveis: a camada externa, com os núcleos das células horizontais, a camada intermediária externa, com os núcleos das células bipolares; intermediária interna, com os núcleos das células de Müller; e a camada interna, com os núcleos das células amácrinas e interplexiformes.¹⁹⁸ Formada pelos núcleos das células horizontais, amácrinas, bipolares e de Müller.
7. Camada Plexiforme Interna (CPI): Marca a junção das células bipolares com as células ganglionares. Camada de sinapses entre as células da CNI e as células ganglionares da retina. Além das conexões sinápticas, contém processos das células de Müller e uma abundante microvasculatura. É a mais espessa e possui maior variedade de sinapses que a camada plexiforme externa.¹⁹⁷
8. Camada de Células Ganglionares (CCG): Formada pelos núcleos das células ganglionares da retina, considerada o segundo neurônio das vias ópticas. As células ganglionares formam uma única camada na periferia, uma dupla camada na região temporal ao disco óptico e 6 a 8 camadas na borda da fóvea. Cerca de 1,2 milhões de células ganglionares estão

presentes na retina. Cada célula apresenta um único axônio. Os axônios das células ganglionares convergem e saem do olho pelo nervo óptico.¹⁹⁷

9. Camada de Fibras Nervosas (CFN): Composta pelo prolongamento central dos axônios das células ganglionares, células gliais e um rico leito capilar de fibras eferentes. Os axônios convergem centripetamente para formar o nervo óptico.

10. Membrana Limitante Interna (MLI): Composta por fibras colágenas, proteoglicanos, membrana basal e membrana plasmática das células de Müller.¹⁹⁷

A fóvea é uma área de 1,5mm de diâmetro, cujo centro está localizado a 4,0mm temporal e a 0,8mm inferior ao centro do disco óptico. Na foveola, centro da fóvea, onde existe cerca de 100.000 cones, a retina está reduzida somente ao elemento receptor. Desaparecem, nessa região: a nuclear interna, plexiforme interna, células ganglionares e a camada de fibras nervosas.¹⁹⁷

A vascularização da retina é assegurada pela Artéria Central da Retina (ACR) e seus ramos e, acessoriamente (em 15% a 20% da população), pela artéria cílio-retiniana oriunda do Círculo de Zinn. Os ramos principais da ACR e Veia Central da Retina (VCR) situam-se na camada de fibras nervosas. Dirigem-se para periferia formando arteríolas e vênulas e, finalmente, densa rede de capilares que se estratifica sem formar um padrão específico, até o nível da nuclear interna, nunca ultrapassando a plexiforme externa. Isso mostra que os fotorreceptores não são nutridos pela ACR, mas sim pelos capilares da coriocapilar.¹⁹⁷

1.9 A Retina do Coelho

Ao se examinar o fundo do olho do coelho, a característica mais marcante é a presença de um disco óptico grande, oval, em forma de concha, com duas grandes faixas brancas opacas partindo do nervo referentes as fibras nervosas ou asa medular (Figura 04).²⁰²

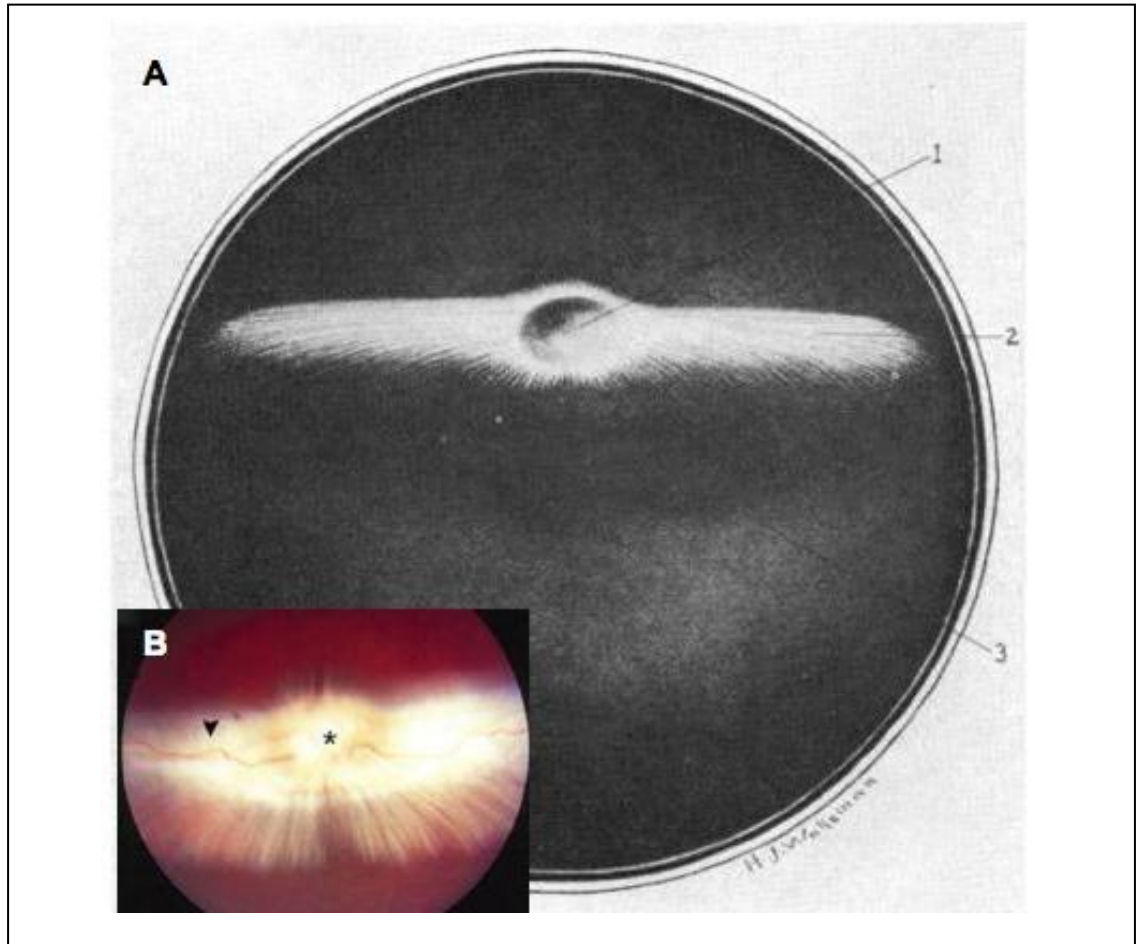


Figura 04: **A**²⁰² Desenho esquemático de fundo do olho pigmentado de coelho; 1- Disco óptico de formato oval, 2- Fibras nervosas (asa medular), 3- Linha pigmentada (mácula?). **B**²⁰³ Retinografia de retina normal de coelho (asterístico - cabeça do nervo óptico; seta - asa medular).

A coloração da retina é de um tom amarelo-alaranjado, mais pálida do que a retina humana ocupando área semelhante, acabando na ora serrata. A retina dos coelhos é menos vascularizada, com presença de extensas regiões avasculares e com ausência de mácula e por conseguinte ausência também de fóvea. Entretanto, há pontos responsáveis por uma melhor qualidade de visão.²⁰²

Esta área com melhor sensibilidade visual provavelmente corresponde a uma região localizada a 3mm abaixo da papila. A mesma se estende horizontalmente abaixo da asa medular e possui aproximadamente de 3 a 4mm de largura. Não é visível facilmente ao exame, no entanto, histologicamente se mostra diferente do resto da retina.²⁰²

A estrutura histológica da retina é essencialmente a mesma do olho humano. A espessura é bastante uniforme, um pouco mais grossa proximal ao nervo e mais afinada ao chegar na periferia próximo a ora serrata.²⁰²

Com relação a parte mais anterior do olho do coelho, pode-se afirmar que tanto a córnea quanto o cristalino são maiores do que o humano quando comparados em proporção as outras estruturas oculares (Figura 05).²⁰² A córnea é mais afinada e maior em diâmetro e não possui a membrana de Bowman^{202, 204}, membrana que promove manutenção estrutural e proteção.²⁰⁵

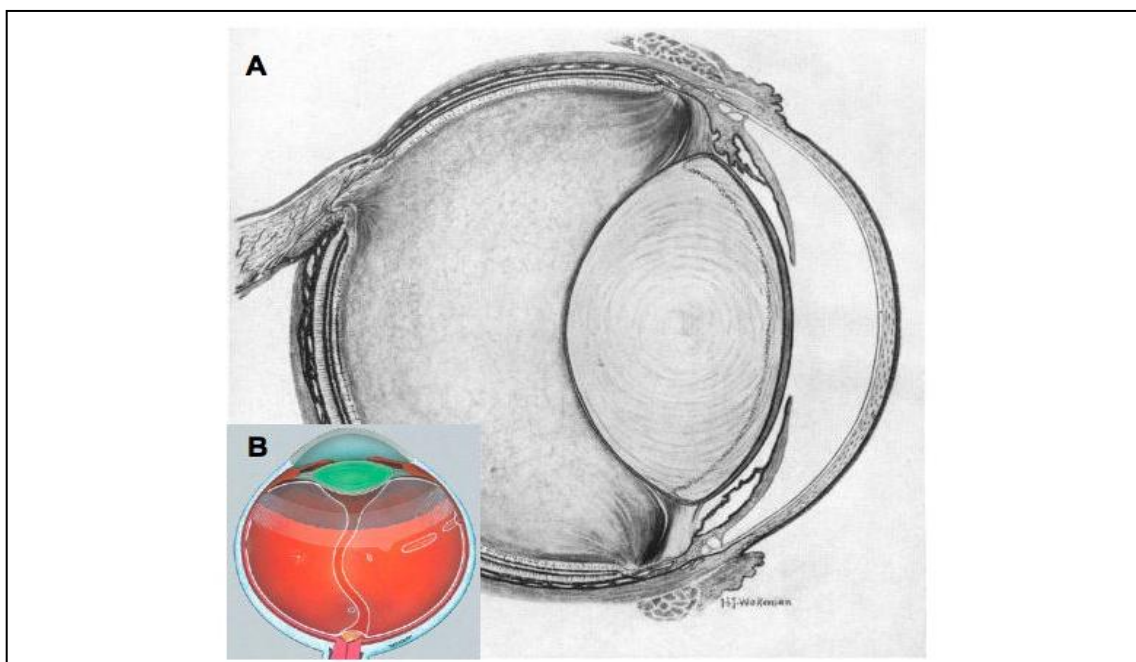


Figura 05: A. Desenho esquemático de corte axial vertical do olho do coelho; B. Desenho esquemático de corte axial vertical do olho do humano. Note o tamanho do cristalino e córnea do coelho, maiores em proporções ao do olho humano.²⁰²

1.10 A Toxicidade da Retina

O uso de drogas intra-vítreas é rotineiramente realizado por especialistas em retina. Toda nova droga deve ser testada primariamente no que se refere a sua segurança e tolerabilidade quanto a toxicidade e outros efeitos adversos. Antes de serem utilizadas em seres humanos as novas drogas são testadas em estudos de cultura de células e em animais.²⁰⁶⁻²⁰⁸

Os experimentos que utilizam cultura de células da retina, além de testar a biocompatibilidade da droga, focam no EPR e/ou neuroretina e permitem a avaliação sistemática da toxicidade da droga de forma controlada.^{209, 210}

Os estudos de toxicidade pré-clínica em animais são concebidos, expondo um número limitado de indivíduos, utilizando a maior dose possível de um composto a fim de determinar o potencial dos efeitos tóxicos. Para dados de segurança, exames de eletrofisiologia e histologia devem ser realizados. Somente após estes dois tipos de estudo, importantes nos estágios iniciais do desenvolvimento de medicamentos, uma nova medicação pode ser liberada para estudos em humanos.²¹¹⁻²¹⁴

Deixando um pouco de lado a droga estudada, alguns pesquisadores têm atribuído diferentes resultados de avaliação da toxicidade a fatores não relacionados a medicamentos ou substâncias químicas, como pH, osmolaridade ou o próprio conservante da formulação do medicamento.²¹⁵⁻²¹⁸

Os processos degenerativos e as lesões tóxicas por medicamentos podem levar a uma reação inflamatória com conseqüente edema e espessamento e, em um estágio final, a perda celular com atrofia retiniana.²¹⁹ A avaliação, portanto, da espessura das camadas celulares da retina pode fornecer dados valiosos relacionados às estas injúrias.

Na preparação de peças para análise histológica, no entanto, artefatos podem surgir e devem ser rigorosamente identificados, para que não sejam falsamente atribuídos a lesões ocorridas ainda *in vivo*. A inclusão em parafina, por exemplo, parte essencial no processo de montagem de lâminas histológicas, eleva a temperatura da peça a mais 60°C, o que pode levar a disrupção dos segmentos externos dos fotorreceptores semelhante ao achado de um descolamento de retina.

Os artefatos, portanto, podem ser exemplificados por:

A vacuolização leve a moderada por edema celular *post-mortem*, desde que não haja comprometimento significativo da espessura da camada. Discreta separação do segmento externo nos fotorreceptores também é atribuída à preparação da peça. Na camada de células ganglionares, é definida como vacuolização leve a moderada aquela em que é possível identificar três células ganglionares ou mais em um diâmetro de 50 micrometros. A visualização de duas ou menos células em um diâmetro de 50 micrometros (separação dos núcleos celulares maior que 25 micrometros), foi definida como vacuolização grave e associada à perda de células ganglionares²²⁰.

A separação da retina neurosensorial do epitélio pigmentado da retina é definida como descolamento de retina prévio a enucleação ou artefato de preparação na peça, baseado nos seguintes critérios: na presença de atrofia do segmento externo dos fotorreceptores e células inflamatórias e/ou pigmentadas no espaço subretiniano, denomina-se descolamento de retina (Figura 06); na ausência, artefato de preparação da peça (Figura 07).

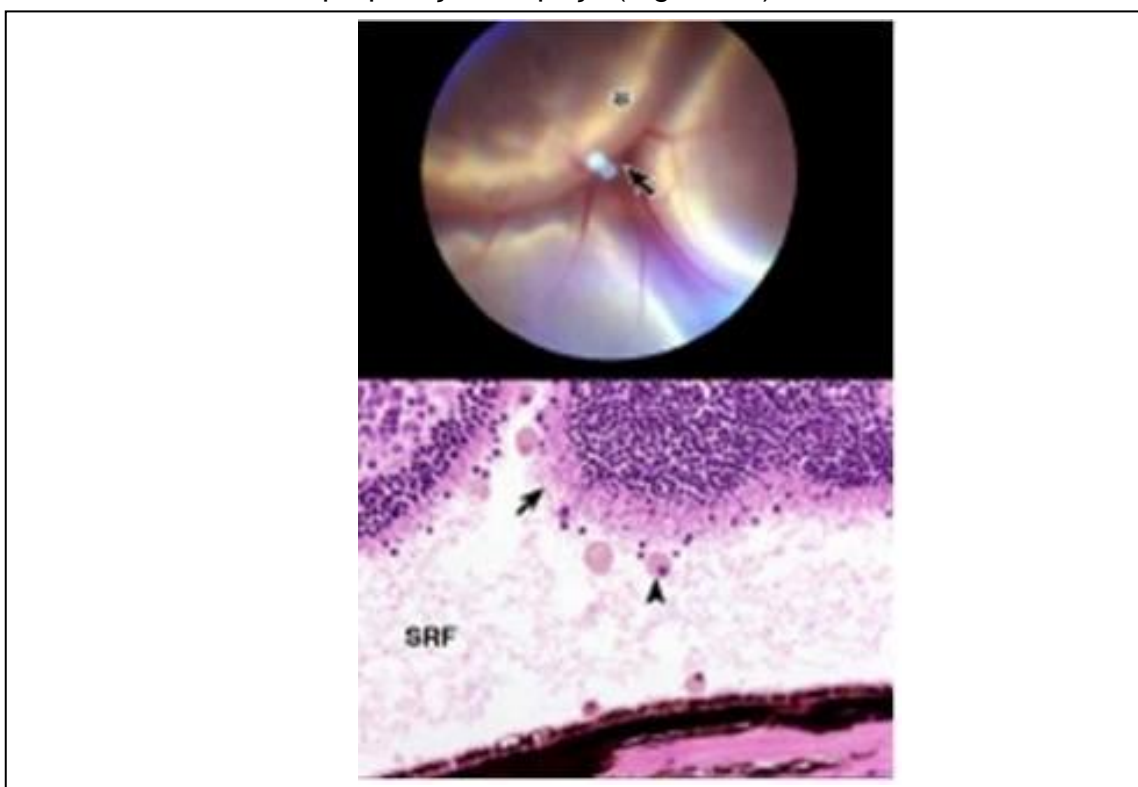


Figura 06: Descolamento de retina. Nota-se a presença de células inflamatórias no espaço subretiniano (cabeça da seta) e atrofia do segmento externo dos fotorreceptores (seta). Reproduzida de Smith, 2000.²²⁰

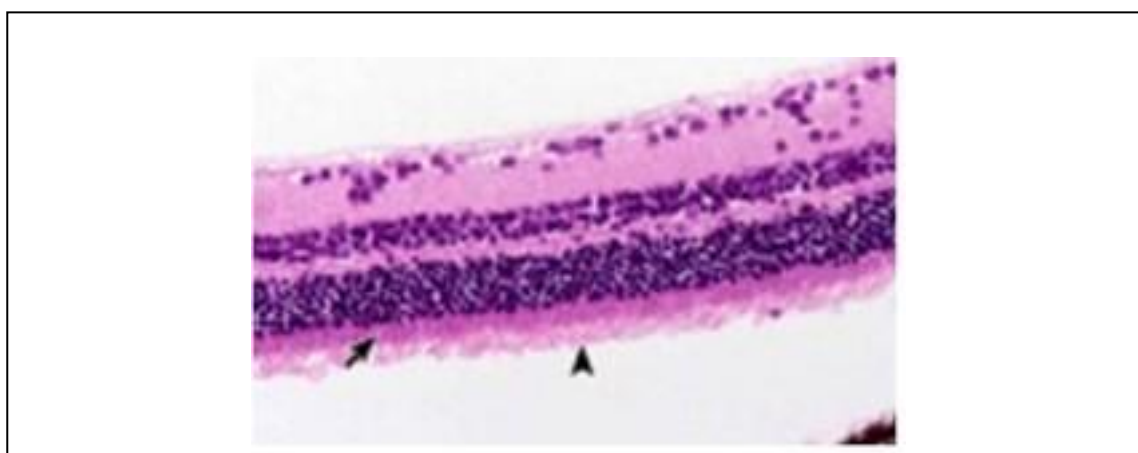


Figura 07: Artefato de preparação da peça com destacamento da retina. Nota-se a preservação do segmento externo dos fotorreceptores e a ausência de células no espaço subretiniano. Reproduzida de Smith, 2000.²²⁰

Um importante sinal de dano retiniano pode ser atrofia da camada de fotorreceptores que leva a baixa visual irreversível. Em uma análise histológica, este achado está associado com uma diminuição do número de estratos celulares na CNE e uma atrofia dos segmentos externos e internos dos fotorreceptores (Figura 08).

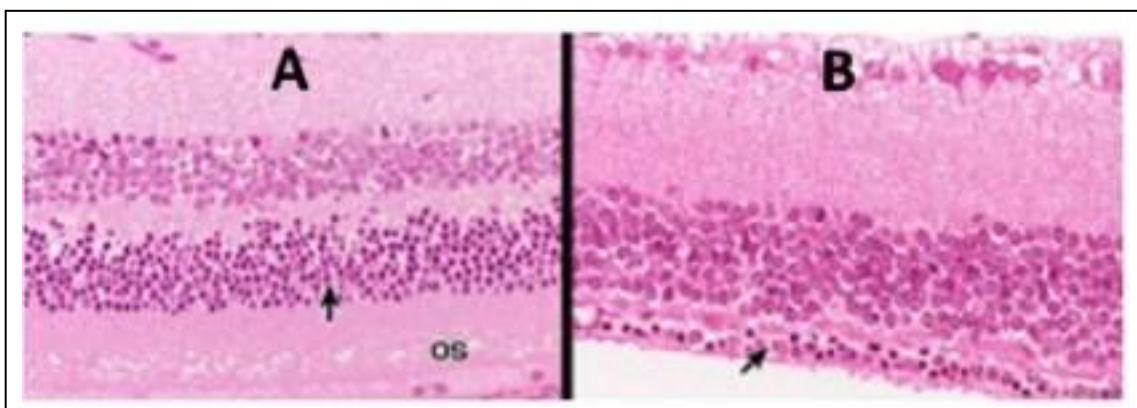


Figura 08: Exemplo de lesão aos fotorreceptores. Na figura A (Retina Normal), percebe-se uma CNE com vários estratos celulares (seta) com segmento externo dos FR (OS) preservado. Na figura B (mesmo olho após degeneração dos FR), percebe-se a CNE em monocamada celular (seta) e uma ausência do segmento interno e externo dos fotorreceptores compatível com atrofia da camada de FR. Reproduzida de Smith, 2000.²²⁰

Portanto, a alteração da espessura das camadas retinianas, em especial a de fotorreceptores, nuclear externa e epitélio pigmentado da retina, pode estar associada à perda celular com atrofia e afinamento ou a edema celular com espessamento. A avaliação desta espessura pode, então, gerar dados valiosos e, muitas vezes, subclínicos sobre lesões tóxicas de medicamentos sobre estas estruturas.

Diante disto, foi realizado neste trabalho, além de um detalhado estudo morfológico da histologia retiniana, a medida da espessura das camadas retinianas para serem avaliados possíveis sinais de atrofia ou edema associados à injeção intra-vítrea da solução salina balanceada e Octreotida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- a. Analisar a toxicidade retiniana da injeção intra-vítrea de octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não albinos.

2.2 Objetivos secundários

- a. Avaliar as alterações histológicas na retina neurosensorial e epitélio pigmentado da retina de coelhos após a aplicação de 0,1ml de solução salina balanceada na cavidade vítrea de olhos de coelhos não albinos.
- b. Determinar a incidência de complicações oculares significativas pós-operatórias associadas à injeção intra-vítrea de Octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não albinos.
- c. Avaliar histologicamente a toxicidade sobre a retina neurosensorial de Octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não albinos três meses após a injeção intra-vítrea de 0,1ml com 0,1mg/ml e 0,5mg/ml da droga (apresentação comercial).
- d. Avaliar histologicamente a toxicidade sobre o epitélio pigmentado da retina de Octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não albinos três meses após a injeção intra-vítrea de 0,1ml com 0,1mg/ml e 0,5mg/ml da droga (apresentação comercial).

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo experimental, placebo-controlado com quarenta olhos de vinte coelhos não albinos, no qual foram realizadas injeções intravítreas em trinta olhos de solução salina balanceada ou Octreotida (Sandostatin®).

O estudo foi conduzido no Centro de Referência em Oftalmologia (CEROF) da Universidade Federal de Goiás – UFG em parceria com a Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB entre julho de 2006 e julho de 2008.

3.2 Considerações Éticas

O estudo foi realizado após sua avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás – UFG e todos os animais foram tratados de acordo com o estatuto para uso de animais em pesquisas da visão e oftalmologia da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).²²¹

3.3 Os Animais

Critérios de inclusão

Foram incluídos vinte coelhos não albinos com peso entre 1920 e 2810 gramas (valor médio do peso = 2320,5g) adquiridos de criatório de coelhos com certificação das autoridades sanitárias. Destes, 55% (11 coelhos) eram do sexo masculino e 45% (09 coelhos) eram do sexo feminino (Tabela 01).

Tabela 1. Distribuição de peso e sexo dos coelhos

COELHO	PESO (gramas)	SEXO
A	2020	Masculino
B	2130	Feminino
C	2640	Masculino
D	2810	Masculino
E	2380	Feminino
01	2420	Masculino
02	1950	Feminino
03	2140	Masculino
04	2370	Feminino
05	2520	Masculino
06	2120	Feminino
07	1980	Feminino
08	2440	Masculino
09	2380	Masculino
10	2160	Feminino
11	1920	Feminino
12	2760	Masculino
13	2430	Feminino
14	2390	Masculino
15	2450	Masculino

Legenda:

A, B, C, D, E - Coelhos não submetidos a injeção intra-vítrea, enucleados/sacrificados no início do estudo

01 ao 15 - Coelhos submetidos à injeção intra-vítrea e enucleados/sacrificados após 90 dias

Avaliação inicial

Foi realizado em todos os coelhos, biomicroscopia através de lâmpada de fenda portátil modelo XL-1 (Shin-Nippon Inc., Tóquio, Japão) para avaliação da córnea, câmara anterior e cristalino, além do exame de oftalmoscopia binocular indireta (OBI) com oftalmoscópio binocular indireto (Welch Allyn Inc., Skaneateles Falls-NY, EUA) utilizando lente específica de 28 dioptrias (Volk Optical Inc., Mentor-OH EUA) na avaliação do segmento vítreo, retina e de qualquer outra alteração da transparência dos meios que pudessem inviabilizar o adequado acompanhamento do fundo de olho pela OBI.

Acompanhamento dos animais

Um médico-veterinário foi responsável pela avaliação diária dos animais e um funcionário responsável pela limpeza diária e alimentação. Cada animal recebeu uma tatuagem na orelha com seu número de identificação (Figura 09).



Figura 09: Identificação por meio de tatuagem numérica na orelha de cada coelho.

Alojamento e gaiolas

Foi criado um alojamento adequado com aproximadamente 50 metros quadrados, coberto, bem ventilado e protegido por telas. Gaiolas individuais metálicas, próprias para coelhos, com 40cm de largura, 45cm altura e 60cm de comprimento foram utilizadas para acomodar cada animal (Figura 10).



Figura 10: Gaiola individual metálica própria para coelhos adultos.

Alimentação

Cada gaiola possuía bebedouro individual com água mineral para consumo diário do animal. Cada coelho foi alimentado com cerca de 80 gramas/dia de ração balanceada peletizada para coelhos (marca Do Sítio Coelho).

Higiene

Duas vezes por dia, a bandeja sob a gaiola era removida e lavada para retirar as fezes e a urina acumuladas. Uma vez por semana, o chão do alojamento era limpo com solução desinfetante e água corrente. Ainda uma vez por semana, os animais eram retirados da gaiola, um a um, sendo colocados em uma gaiola sobressalente, individualmente. Naquele momento, cada gaiola era flambada para garantir a assepsia ideal para a sobrevivência do animal.

Quarentena

Todos os animais adquiridos passaram por um período de 40 dias, no qual o animal permaneceu no alojamento antes da realização dos procedimentos. Tal procedimento serviu para avaliação da boa adaptação do animal e para evitar que qualquer intercorrência pela adaptação inicial do coelho ao meio fosse falsamente atribuída a qualquer um dos procedimentos propostos.

Critérios de exclusão

Foram excluídos do trabalho coelhos que apresentaram durante o período de quarentena qualquer sinal de alteração retiniana, opacidade de meios oculares, doença infecciosa ocular ou sistêmica ou, ainda, qualquer outra que pudesse comprometer seu adequado acompanhamento ou a possibilidade do animal atingir o final do estudo.

3.4 A Droga

Formas farmacêuticas e apresentações:

Solução para injeção (subcutânea) ou concentrado de solução para infusão (infusão intravenosa). Embalagem com 5 ampolas de 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml ou 0,5 mg/ml.

O medicamento é indicado para uso adulto, fabricado e distribuído pelo Laboratório Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça.

Foram compradas, pelos autores do estudo, 2 embalagens, uma de 0,1 mg/ml e outra de 0,5 mg/ml (Figura 11).



Figura 11: Embalagem de Octreotida (Sandostatin®) utilizada no estudo.

3.5 Grupos de Estudo

Os coelhos foram divididos em quatro grupos, sendo o primeiro grupo, denominado controle, composto por cinco coelhos (dez olhos), onde não foi realizada injeção intra-vítrea e já submetidos à eutanásia no início do estudo, após o período de quarentena.

Os trinta olhos dos demais coelhos foram distribuídos por sorteio de forma mascarada, em três grupos (1:1:1): Grupo P, no qual foi realizada injeção de 0,1ml de solução salina balanceada (BSS); Grupo 1, no qual foi realizada a injeção de 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida; e Grupo 2, no qual foi realizada a injeção de 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida.

O grupo P foi considerado o grupo placebo e utilizado para controle da injeção intra-ocular pela comparação dos possíveis efeitos da droga nos grupos 1 e 2 (Tabela 02).

Os quinze coelhos foram seguidos por um período de noventa dias após a injeção, quando, então, tiveram seus bulbos oculares enucleados, seguido de sua eutanásia.

Tabela 2. Distribuição dos olhos dos coelhos submetidos à injeção intra-vítrea nos grupos de estudo

COELHO	OLHO	GRUPO
01	D	1
01	E	1
02	D	2
02	E	1
03	D	P
03	E	2
04	D	2
04	E	2
05	D	1
05	E	P
06	D	2
06	E	1
07	D	P
07	E	P
08	D	1
08	E	2
09	D	2
09	E	1
10	D	2
10	E	P
11	D	P
11	E	1
12	D	P
12	E	1
13	D	2
13	E	P
14	D	1
14	E	P
15	D	2
15	E	P

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

P = Grupo Placebo

1 = Grupo 1 (Sandostatin 0,1mg/ml)

2 = Grupo 2 (Sandostatin 0,5mg/ml)

3.6 Momentos Experimentais

Os dados relativos aos atributos avaliados foram obtidos nos seguintes momentos:

M0: Realizado anestesia dos cinco animais do grupo controle seguida da enucleação dos seus 10 globos oculares após avaliação ocular completa.

M1: 4 horas após M0. Realizado anestesia dos quinze animais dos grupos 1, 2 e placebo; aferição da PIO de ambos os olhos e injeções intra-vítreas de Octreotida (Sandostatin®) e BSS.

M2: 6 horas após M0. Feita nova aferição da PIO nos quinze coelhos dos grupos 1, 2 e placebo.

M3: 28 horas após M0. Avaliação pós-operatória.

M4: 52 horas após M0. Avaliação pós-operatória e realização de nova aferição da PIO nos quinze coelhos dos grupos 1, 2 e placebo.

M5: Avaliações oftalmológicas do segmento anterior através de biomicroscopia e oftalmoscopia binocular indireta para avaliação vítrea e retiniana realizada no 7^o, 30^o, 60^o, 90^o dias de pós-operatório.

M6: 90 dias após M0. Realizado anestesia dos quinze animais dos grupos 1, 2 e placebo seguidos da enucleação dos 30 olhos e eutanásia.

A medida que os olhos eram enucleados foi iniciado o processo de preparação para posterior avaliação histopatológica.

3.7 Procedimentos

No próprio alojamento, em local asséptico e em mesa cirúrgica apropriada e limpa, foram realizados a anestesia geral e os procedimentos oculares.

A biomicroscopia

A biomicroscopia bilateral foi realizada antes e após a injeção intra-ocular, no 1^o, 2^o, 7^o, 30^o, 60^o dias do pós-operatório, assim como antes e após a enucleação, para se averiguar todo o segmento anterior, a transparência dos meios, cristalino, vítreo anterior e quaisquer sinais de processos inflamatórios e/ou infecciosos.

A oftalmoscopia binocular indireta

A Oftalmoscopia binocular indireta (OBI) foi realizada antes e após a injeção intra-ocular, no 1º, 2º, 7º, 30º, 60º dias do pós-operatório, assim como antes e após a enucleação, para se averiguar a integridade retiniana e a transparência de meios adequada. A OBI serviu para evitar que qualquer alteração anterior à injeção ou posterior à enucleação fossem falsamente atribuída ao procedimento.

A tonometria

Os animais do estudo foram submetidos a tonometria de contato de ambos os olhos através do Tonômetro de Perkins (Clement Clarke Inc. Columbus-OH,EUA) após instilação de colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% para anestesia tópica e fluoresceína sódica 1% numa diluição de 1:1. A tonometria foi realizada em três momentos distintos: antes da injeção intra-vítrea, duas horas após o procedimento e 48 horas depois da injeção.

A injeção intra-ocular

Os coelhos foram anestesiados por uma injeção intra-muscular combinada de cloridrato de xylazina (5mg/kg) e cloridrato de ketamina (25mg/kg) e, quando necessário, a dose das drogas foi progressivamente aumentada até que fosse atingido o plano anestésico adequado. Foi considerada profundidade cirúrgico-anestésica ideal quando, após provocação de estímulo doloroso na pata do animal, não foi percebido nenhum tipo de contração muscular ou lacrimejamento, garantindo, assim, total analgesia trans-operatória²²².

Foi utilizada uma mistura de colírios de tropicamida 1% e fenilefrina a 10% (1:1) para se atingir dilatação pupilar e colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% para anestesia tópica. De acordo com os padrões de conduta para injeção intra-vítrea²²³, após anti-sepsia local com colírio de iodo-povidona 5%, aposição de campo cirúrgico estéril com adequada proteção ciliar e colocação do blefarostato, foi realizada, pelo autor principal deste trabalho, uma única injeção intra-vítrea via *pars plana* com agulha de calibre 30 *gauge* a 2mm do limbo superior, definidos por sorteio e mascarada, de 0,1ml de BSS ou

de 0,1ml com 0,1mg/ml ou 0,5mg/ml da droga em estudo – Octreotida (Sandostatin®). (Figura 12)



Figura 12: Injeção intra-vítrea a 2mm do limbo depois de adequada anti-sepsia e isolamento ciliar.

Foram utilizados frascos-ampola de Octreotida contendo 1ml na concentração de 0,1mg/ml e aspirado e injetado 0,1ml para o Grupo 1, e frascos-ampola contendo 1ml na concentração de 0,5mg/ml e aspirado e injetado 0,1ml para o Grupo 2. No Grupo P, foi injetado 0,1ml de BSS.

Após a injeção, os coelhos retornaram para suas gaiolas e ficaram em observação pelo veterinário para, caso surgisse algum sinal de dor ou desconforto, eles fossem devidamente medicados (buprenorfina 0,05mg/kg subcutânea).

A avaliação oftalmológica pós-operatória

Todos os coelhos foram avaliados nos 1º, 2º, 7º, 30º, 60º, 90º dias pós-operatórios por meio de biomicroscopia do segmento anterior e oftalmoscopia binocular indireta para avaliação do possível surgimento de complicações pós-operatórias relacionadas ao procedimento de injeção intra-vítrea (catarata, endoftalmite, descolamento de retina e outras opacidades de meios). Foi

utilizado colírio combinado de Tobramicina 0,3% e Dexametasona 0,1% de 6 em 6 horas por uma semana.

A enucleação

A indução anestésica foi feita com injeção intra-muscular de ketamina (25mg/kg) e xylazina (10mg/kg) e, após punção da veia lateral da orelha do animal, mantida com tiopental sódico (10mg/kg) endovenoso (Figura 13). Quando necessário, a dose do tiopental foi progressivamente aumentada até que fosse atingido o plano anestésico adequado. Foi, novamente, considerada a profundidade cirúrgico-anestésica ideal quando, após provocação de estímulo doloroso na pata do animal, não foi percebido nenhum tipo de contração muscular ou lacrimejamento, garantindo, assim, total analgesia trans-operatória²²².

Foi feita, então, pelo autor principal deste trabalho, cuidadosa enucleação dos dois bulbos oculares que, imediatamente banhados com solução salina balanceada, foram armazenados em solução de fixação paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1M com pH de 7,4.



Figura 13: Punção da veia lateral da orelha do coelho.

A eutanásia

Após a enucleação dos dois bulbos oculares, ainda com o animal sob anestesia geral, o médico veterinário responsável pelos coelhos, realizou uma injeção endovenosa de pentobarbital (250mg/kg) levando ao falecimento do animal, confirmada pela ausência de batimentos cardíacos e movimentos respiratórios.

3.8 A Análise Histológica da Retina

Os olhos enucleados foram deixados na solução de fixação por 24 horas num volume de 10/1, a solução foi trocada após este período por nova solução e mesmo volume permanecendo por mais 48 horas. A seguir, foram desidratados por imersão em série crescente de etanol de 50, 70, 90 e 100% e depois incluídos em parafina.

Os blocos foram levados ao micrótomo e cortados com 5µm de espessura em sentido sagital orientados pelo nervo óptico até uma distância de 3 diâmetros de disco do nervo óptico, sendo, posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina.

Foi realizado, então, análise histológica em microscopia óptica no microscópio Zeiss Axioplan 2 com sistema de captura de imagens AxioPhot2 através do software analySIS Imager Zeiss.

Os seguintes aspectos histológicos foram avaliados:

1- Descrição morfológica das camadas da retina neurosensorial e do epitélio pigmentado da retina.

2 - Medidas da espessura do epitélio pigmentado da retina, da camada de fotorreceptores, da camada nuclear externa, da camada nuclear interna e do número de estratos celulares da nuclear externa.

Uma lesão sobre os fotorreceptores foi definida como a diminuição do número de estratos celulares e espessura da camada nuclear externa associada à diminuição da espessura da camada de fotorreceptores (atrofia).

Uma possível lesão do epitélio pigmentado associada à injeção intravítrea foi definida como atrofia, caso houvesse áreas de descontinuidade no seu aspecto ou afinamento significativo em sua espessura associado à diminuição da espessura da camada de fotorreceptores; e hipertrofia, caso houvesse aumento significativo de sua espessura associado a processo inflamatório prévio.

Foram avaliadas cinco lâminas de cada olho por pelo menos dois avaliadores diferentes, especialistas em estudos histológicos da retina e

oftalmologistas retinólogos, em momentos diversos e de forma mascarada (o avaliador não sabia a qual olho nem a qual grupo pertenciam as lâminas).

Cada avaliador definiu a descrição morfológica da retina e as espessuras das camadas retinianas de cada olho baseado no grupo de lâminas. O valor médio entre as medidas dos avaliadores foi definido como a espessura da camada retiniana de cada olho. Este protocolo foi seguido e repetido nos quarenta olhos do estudo.

3.9 Expressão dos Resultados e Análise Estatística

Após coleta dos resultados, os dados foram desmascarados e atribuídos a cada olho de coelho dentro dos grupos de estudo. Os resultados das variáveis contínuas foram expressos por suas médias aritméticas e respectivos desvios-padrão ou por suas medianas e distâncias inter-quartílicas e os de variáveis categóricas por suas respectivas freqüências absolutas e relativas.

Foram utilizados os testes de análise de variância (ANOVA), t-student para amostras pareadas e não pareadas na avaliação de possíveis diferenças entre médias e os testes de Mann-Withney e Wilcoxon para avaliação de diferenças entre medianas. O teste do qui-quadrado avaliou possíveis diferenças entre freqüências. Um valor de $p < 0,05$ foi utilizado para rejeitar a hipótese de nulidade.

4 RESULTADOS

O grupo controle, em que não foi realizada nenhuma injeção intra-vítrea, composto por dez olhos, apresentou valor médio do peso de 2396 gramas, sendo 60% do sexo masculino e 40% do feminino (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo controle com respectivos peso e sexo

COELHO	OLHO	PESO (gramas)	SEXO
A	D	2020	Masculino
A	E	2020	Masculino
B	D	2130	Feminino
B	E	2130	Feminino
C	D	2640	Masculino
C	E	2640	Masculino
D	D	2810	Masculino
D	E	2810	Masculino
E	D	2380	Feminino
E	E	2380	Feminino

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

O grupo placebo em que foi realizada injeção intra-vítrea de solução salina balanceada, composto por dez olhos, apresentou valor médio do peso de 2273 gramas, sendo 50% do sexo feminino e 50% do masculino (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo placebo com respectivos peso e sexo

COELHO	OLHO	PESO (gramas)	SEXO
3	D	2140	Masculino
5	E	2520	Masculino
7	D	1980	Feminino
7	E	1980	Feminino
10	E	2160	Feminino
11	D	1920	Feminino
12	D	2760	Masculino
13	E	2430	Feminino
14	E	2390	Masculino
15	E	2450	Masculino

Legenda:

D = Olho direito E = Olho esquerdo

O grupo 1, também composto por dez olhos, em que foi realizada injeção intra-vítrea de 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida, apresentou valor médio do peso de 2332 gramas, sendo 70% do sexo masculino (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo 1 com respectivos peso e sexo

COELHO	OLHO	PESO (gramas)	SEXO
1	D	2420	Masculino
1	E	2420	Masculino
2	E	1950	Feminino
5	D	2520	Masculino
6	E	2120	Feminino
8	D	2440	Masculino
9	E	2380	Masculino
11	E	1920	Feminino
12	E	2760	Masculino
14	D	2390	Masculino

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

O grupo 2 em que foi realizada injeção intra-vítrea de 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida, composto por dez olhos, apresentou valor médio do peso de 2281 gramas, sendo 60% do sexo feminino (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição dos olhos dos coelhos no grupo 2 com respectivos peso e sexo

COELHO	OLHO	PESO (gramas)	SEXO
2	D	1950	Feminino
3	E	2140	Masculino
4	D	2370	Feminino
4	E	2370	Feminino
6	D	2120	Feminino
8	E	2440	Masculino
9	D	2380	Masculino
10	D	2160	Feminino
13	D	2430	Feminino
15	D	2450	Masculino

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

Com relação a comparação do peso e do sexo dos coelhos entre os grupos do estudo, a Tabela 7, mostra a média e desvio padrão do peso e a distribuição do sexo dos coelhos. Os resultados do teste ANOVA e do teste exato de Fisher indicam, respectivamente, a homogeneidade das médias do peso ($p = 0,806$) e do sexo dos coelhos ($p = 0,675$) entre os grupos estudados.

Tabela 7. Média e desvio padrão do peso e distribuição do sexo dos coelhos, segundo os grupos do estudo.

Grupos do estudo	N	Peso Média ± dp	Sexo	
			Masculino n(%)	Feminino n (%)
Controle	5	2396.0 ± 332.9	3 (60,0)	2 (40,0)
Placebo	10	2273.0 ± 277.8	5 (50,0)	5 (50,0)
Grupo 1	10	2332.0 ± 260.8	7 (70,0)	3 (30,0)
Grupo 2	10	2281.0 ± 173.7	4 (40,0)	6 (60,0)
Total	35	2309.7 ± 247.7	19 (54,3)	16 (45,7)
Valor de p		0,806	0,675	

Legenda

dp = Desvio padrão

Quando avaliamos a tonometria dos olhos dos coelhos nota-se aumento da PIO após duas horas do procedimento e depois sua normalização (Gráfico 1). A Tabela 8 apresenta as médias da PIO, de acordo com a lateralidade do olho e o momento da mensuração. O teste de comparações múltiplas de Sidak mostra que a PIO média, após duas horas, foi significativamente maior que PIO média antes ($p < 0.001$) e a PIO média após 48 horas ($p < 0.001$). Entretanto, a diferença de médias entre a PIO antes e a PIO após 48 horas não foi estatisticamente significante nem no olho direito ($p = 0,06$) nem no olho esquerdo ($p = 0,524$).

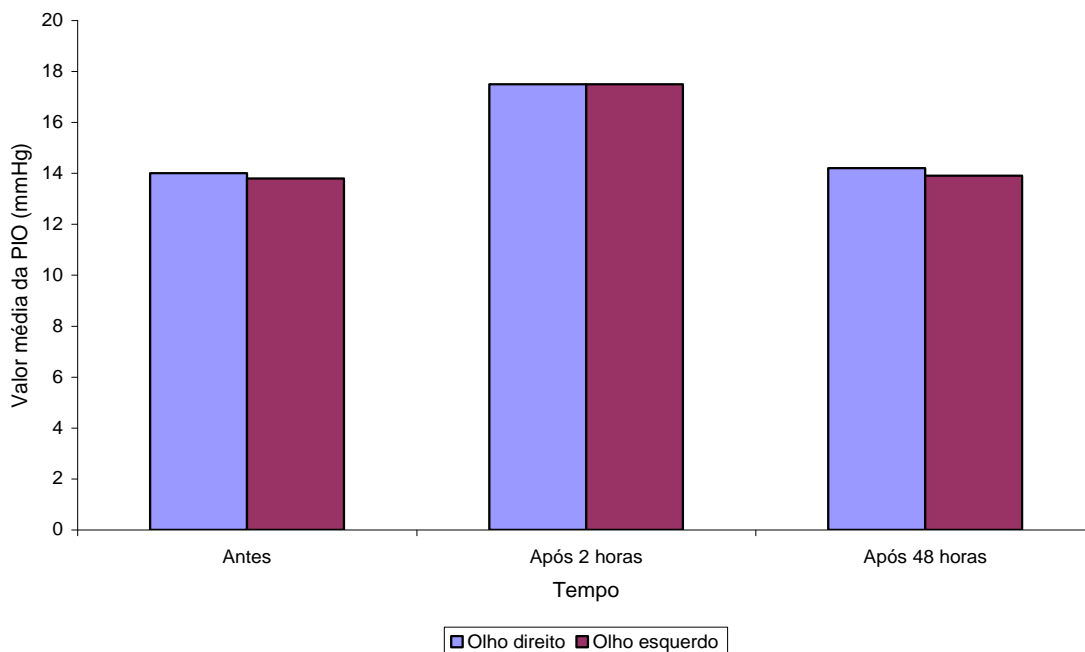
Tabela 8. Estatísticas descritivas (média e desvio padrão) da PIO, de acordo com a lateralidade do olho e o momento da mensuração.

Olho	Tempo			Média marginal
	Antes	Após 2 horas	Após 48 horas	
Direito, média ± dp*	14,0 ± 0,7	17,5 ± 0,9	14,2 ± 0,7	15,2 ± 1,8
Esquerdo, média ± dp	13,8 ± 0,6	17,5 ± 0,7	13,9 ± 0,4	15,0 ± 1,8
Média marginal, média ± dp	13,9 ± 0,7	17,5 ± 0,8	14,1 ± 0,6	-

Legenda

*dp = desvio padrão

Gráfico 1. Média da PIO, de acordo com a lateralidade do olho e o momento da mensuração.



A análise dos efeitos causados pela injeção intra-vítrea foram divididos em dois grupos: uns relacionados ao procedimento e outros relacionados à droga.

4.1 Os efeitos do procedimento de injeção intra-vítrea em olhos de coelhos não albinos.

Nos trinta olhos submetidos à injeção intra-vítrea:

- Não houve caso de falecimento ou doença sistêmica nos coelhos.
- Não houve opacificação dos meios sugestiva de turvação vítrea associada à endoftalmite ou quaisquer outras infecções ou inflamações.
- Não houve caso de opacificação importante do cristalino que impedisse o adequado acompanhamento do fundo de olho pela oftalmoscopia binocular indireta. Em seis olhos, dos trinta em que foram realizadas injeções intra-vítreas (20%), houve discreta opacificação localizada do cristalino superior, próximo ao sítio de injeção.
- Não houve caso de descolamento de retina ou desprendimento vítreo em nenhum dos olhos do estudo.

- Em todos os olhos (100%), houve surgimento de edema de córnea súbito e transitório logo após a realização da injeção intra-vítrea. A oftalmoscopia binocular indireta após as injeções, no entanto, confirmou o fluxo sanguíneo normal pela artéria central da retina.
- Quatro olhos (13,33%) apresentaram hemorragia subconjuntival localizada no sítio da injeção.

4.2 Os efeitos da Octreotida em olhos de coelhos não albinos: análise histológica.

4.2.1 Grupo controle

No grupo em que não foi realizada injeção intra-vítrea, foram observados os seguintes aspectos nos olhos: (Figura 14)

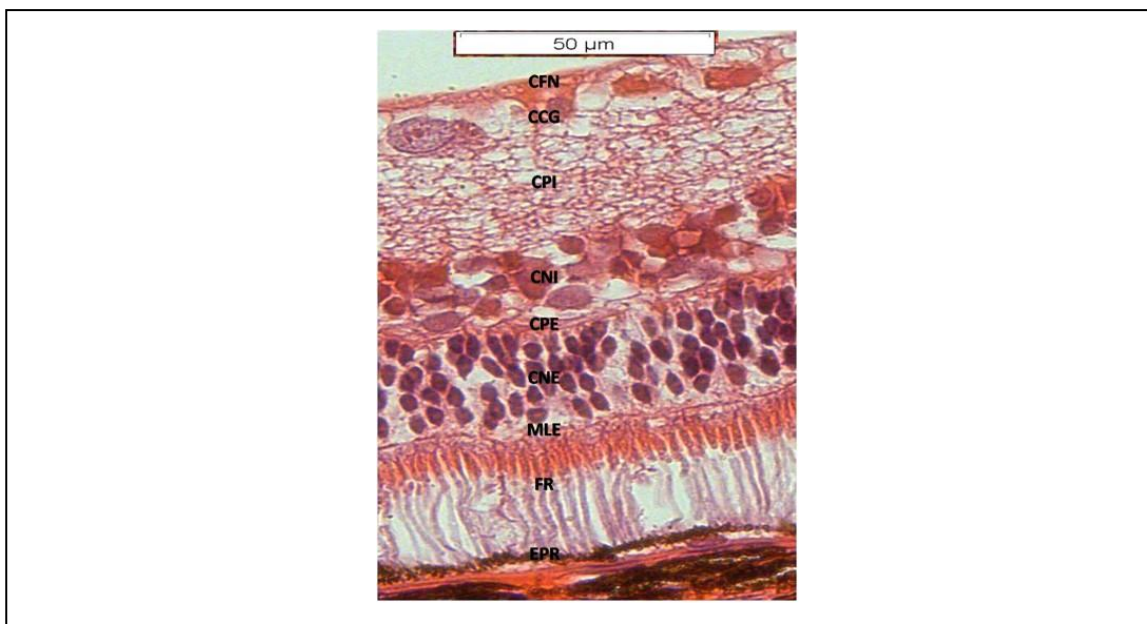


Figura 14: Grupo Controle - olho direito do coelho C. Microfotografia da lâmina para análise histológica da retina neurosensorial e epitélio pigmentado da retina. EPR - Epitélio Pigmentado da Retina; FR - camada de fotorreceptores; MLE - Membrana Limitante Externa; CNE - Camada Nuclear Externa; CPE - Camada Plexiforme Externa; CNI - Camada Nuclear Interna; CPI - Camada Plexiforme Interna; CCG - Camada de Células Ganglionares; CFN - Camada de Fibras Nervosas. Nota-se morfologia normal, boa definição e organização das camadas retinianas.

Camada de fotorreceptores: corresponde ao segmento externo e interno dos fotorreceptores dispostos um ao lado do outro. Pequenas áreas de

vacuolização ou separação dos segmentos externos sem aumento ou diminuição da espessura da camada foram consideradas artefatos. A medida de sua espessura teve valor médio de $30,6 \pm 4,3\mu\text{m}$. (Figura 15).

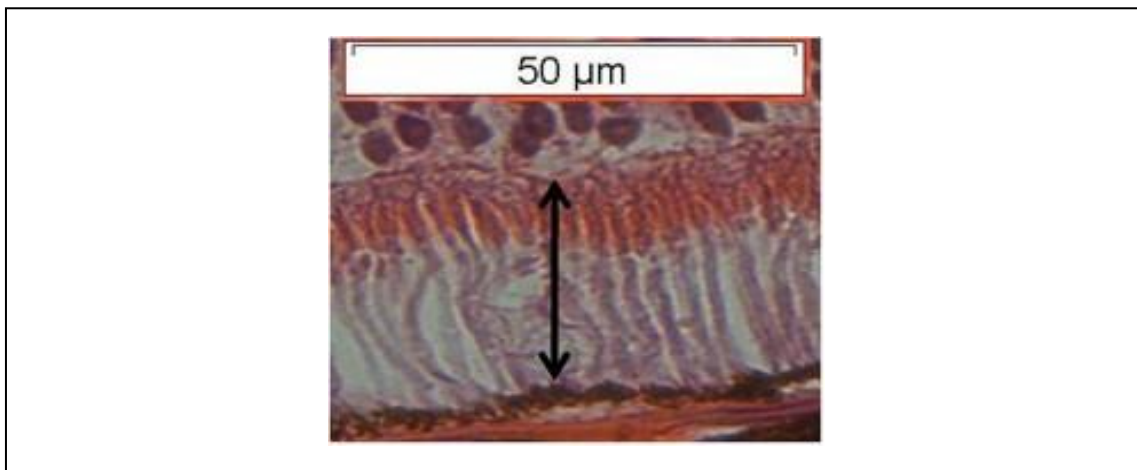


Figura 15: Grupo Controle - olho direito do coelho C. Espessura da camada de fotorreceptores compreendida entre o EPR e a MLE apresentou valor médio de $30,6 \pm 4,3\mu\text{m}$.

Membrana Limitante Externa: linha contínua separando os FR da CNE.

Camada Nuclear Externa (CNE): corresponde ao núcleo dos fotorreceptores. É percebida uma justaposição de 5 a 6 estratos celulares que compõem sua espessura. Pequenas áreas de vacuolização e separação celular sem aumento da espessura da camada também foram consideradas como artefatos. A sua espessura teve valor médio de $28,8 \pm 3,0\mu\text{m}$. (Figura 16)

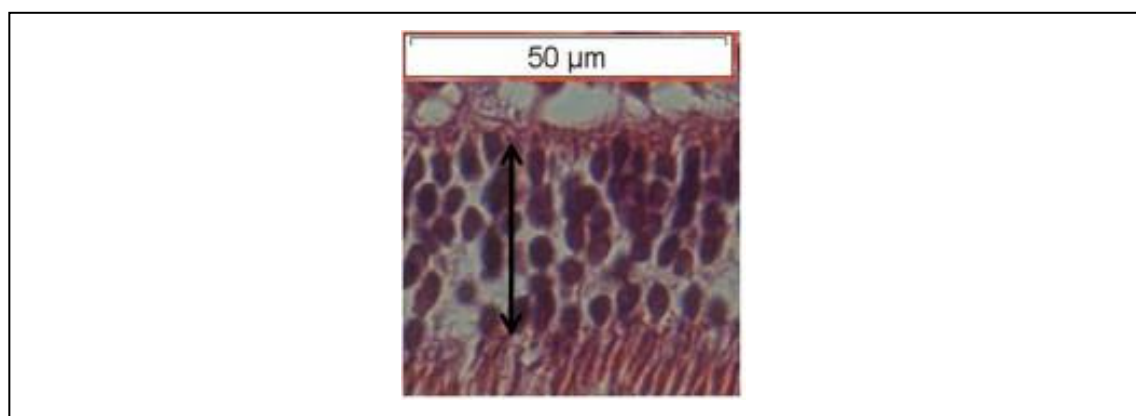


Figura 16: Grupo Controle. A espessura da camada nuclear externa (CNE), compreendida entre a Membrana Limitante Externa e a Camada Plexiforme Externa, apresentou valor médio de $28,8 \pm 3,0\mu\text{m}$. Nota-se 5 a 6 estratos celulares com seus núcleos corados pela hematoxilina compondo a espessura da CNE.

Camada Plexiforme Externa: delgada região eosinofílica de sinapse entre os núcleos dos fotoreceptores, células amácrinas, horizontais e bipolares.

Camada Nuclear Interna (CNI): região de núcleo das células amácrinas, horizontais, bipolares e de Müller. Existe a presença de vacúolos formados no processo de preparação da peça. Sua espessura teve valor médio de $17,1 \pm 1,5\mu\text{m}$. (Figura 17).

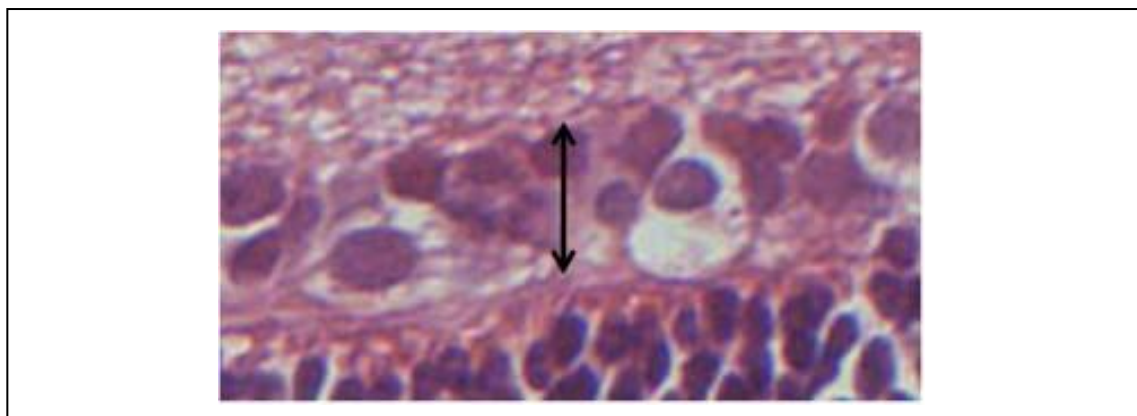


Figura 17: Grupo Controle. A espessura da camada nuclear interna (CNI), compreendida entre a Camada Plexiforme Externa e a Camada Plexiforme Interna, apresentou valor médio de $17,1 \pm 1,5\mu\text{m}$.

Camada Plexiforme Interna: região eosinofílica de sinapses.

Camada de Células Ganglionares: região de distribuição celular irregular e esparsa apresentando vacuolização leve a moderada (artefato). (Figura 18).

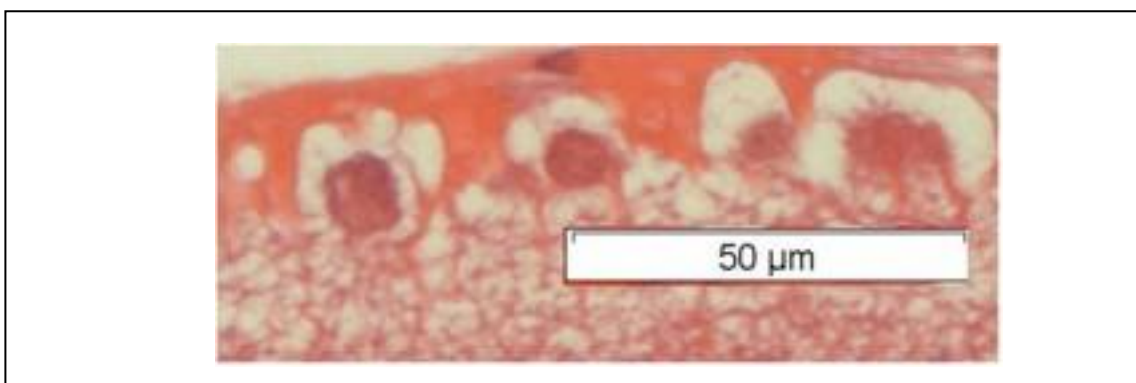


Figura 18: Grupo Controle. Camada de células ganglionares.

Camada de fibras nervosas: região eosinofílica correspondendo ao prolongamento central dos axônios das células ganglionares.

Membrana limitante interna: não visualizada nas peças estudadas.

Epitélio pigmentado da retina (EPR): mostrou-se como uma camada pigmentar contínua, sem pontos de descontinuidade. Pequenas áreas de descolamento foram consideradas artefatos do processo de fixação e inclusão na parafina. Sua espessura teve valor médio de $3,9 \pm 0,7\mu\text{m}$. (Figura 19)

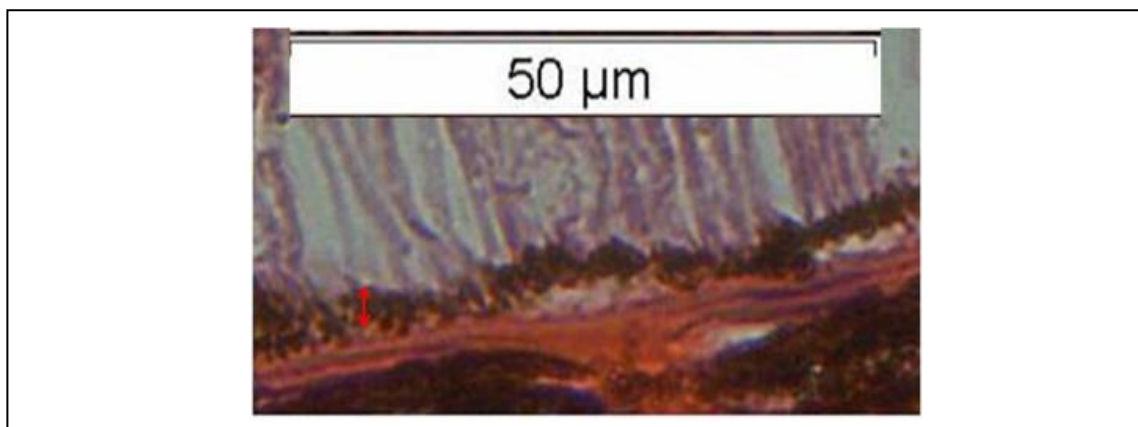


Figura 19: Grupo Controle, olho direito do coelho C. Aspecto contínuo do EPR e a sua espessura com valor médio de $3,9 \pm 0,7\mu\text{m}$ (seta vermelha). Observa-se pequenas áreas de descolamento pigmentar consideradas artefatos.

As medidas das camadas EPR, FR, CNE, CNI e do número de estratos celulares da CNE do grupo controle é descrita na tabela a seguir (Tabela 9).

Tabela 9. Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo controle.

COELHO	OLHO	EPR	ESPESSURA (μm)			CAMADAS CNE
			FR	CNE	CNI	
A	D	4,8	30,9	33,6	17,5	6
A	E	3,2	23,6	22,3	15,8	5
B	D	3,4	38,4	28,6	17,3	6
B	E	4,5	32,8	27,8	14,1	6
C	D	4,9	34,0	27,7	17,8	5
C	E	2,8	26,0	29,4	19,3	6
D	D	4,2	27,2	31,7	16,3	5
D	E	3,9	31,1	27,6	17,1	5
E	D	3,7	28,9	28,4	17,9	6
E	E	4,1	33,4	30,5	18,4	5

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

4.2.2 Grupo placebo

Não foram observadas diferenças significantes entre a análise morfológica da retina neurossensorial do grupo controle e do grupo placebo, no qual foi injetado 0,1ml de solução salina balanceada. Não foram percebidas

áreas de atrofia da camada dos fotorreceptores e da nuclear externa compatível com lesão de fotorreceptores, nem espessamento significativo das demais camadas sugestivas de edema, vacuolização ou inflamação. Nenhum dos olhos apresentou áreas de descolamento de retina ao exame histológico. (Figura 20)

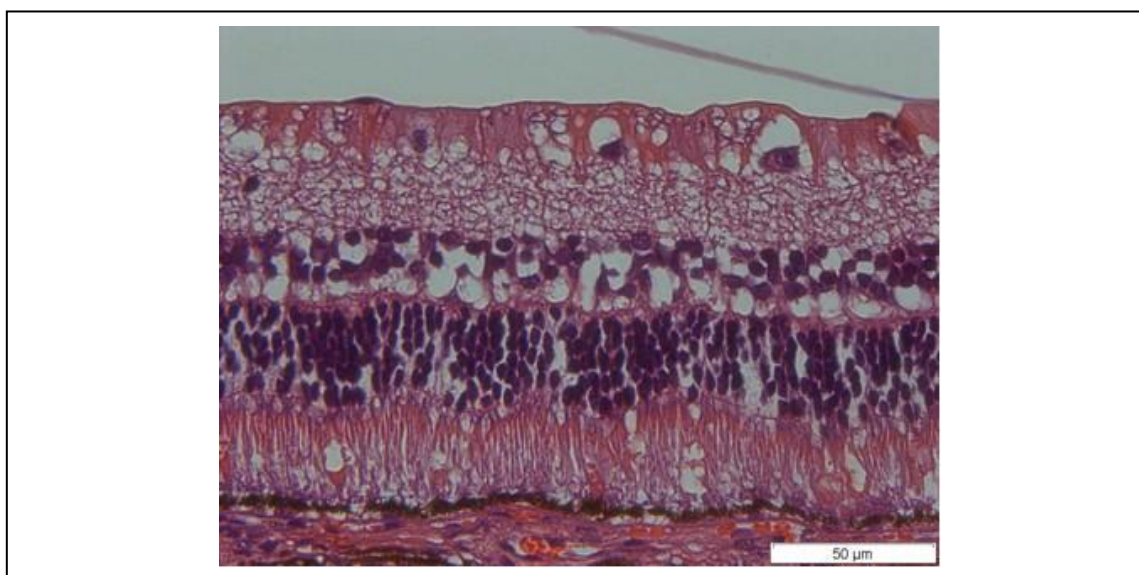


Figura 20: Grupo Placebo, olho esquerdo do coelho 2. Não foram observadas diferenças significantes na morfologia histológica da retina, quando comparada ao grupo controle.

As medidas das espessuras das camadas EPR, FR, CNE e CNI, assim como o número de estratos celulares na CNE estão descritos na tabela abaixo (Tabela 10).

Tabela 10. Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo placebo

OLHO	COELHO	EPR	ESPESSURA (μm)			CAMADAS CNE
			FR	CNE	CNI	
3	D	3,7	26,7	28,2	19,1	5
5	E	4,1	28,1	31,3	21,4	6
7	D	4,5	30,3	27,9	20,6	5
7	E	4,3	26,5	31,7	17,9	5
10	E	4,0	27,8	30,8	18,0	6
11	D	3,4	31,7	24,9	19,4	5
12	D	3,1	24,2	23,4	21,5	6
13	E	3,2	25,4	28,0	15,1	6
14	E	3,6	36,6	22,6	14,9	7
15	E	3,5	27,9	26,4	14,7	5

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

Não foi observada diferença significativa entre o valor médio das medidas das espessuras das camadas EPR, FR, CNE e CNI, assim como do número de estratos celulares na CNE entre os grupos controle e placebo (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação das espessuras das camadas de EPR, FR, CNE, CNI e do número de estratos celulares na CNE entre os grupos de controle e placebo

GRUPO	ESPESSURA (μm) ¹				CAMADAS CNE ²
	EPR	FR	CNE	CNI	
CONTROLE	3,9 ± 0,7	30,6 ± 4,3	28,8 ± 3,0	17,1 ± 1,5	5,5
PLACEBO	3,7 ± 0,5	28,5 ± 3,6	27,5 ± 3,2	18,3 ± 2,6	5,5
Valor de p	0,44 ³	0,25 ³	0,38 ³	0,26 ³	0,83 ⁴

Legenda:

¹ - Valor médio em micrômetros ± Desvio-Padrão (DP)

² - Valor mediano (distância inter-quartílica)

³ - Teste t de Student para amostras não-pareadas

⁴ - Teste de Mann-Whitney

4.2.3 Grupo 1

O grupo 1, em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida intra-vítreo, não apresentou diferenças significantes no estudo histológico da retina neurossensorial em relação ao grupo placebo. Não foram percebidas áreas de atrofia da camada dos fotorreceptores e nuclear externa compatível lesão de fotorreceptores, nem espessamento significativo das demais camadas sugestivas de edema ou inflamação. Nenhum dos olhos apresentou áreas de descolamento de retina verdadeiro em exame histológico. (Figura 21)

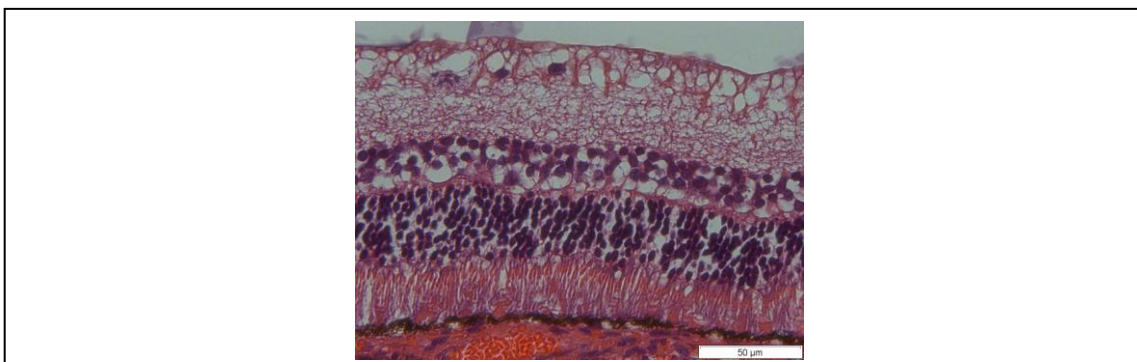


Figura 21: Grupo 1 - Injeção intra-vítreo de 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida - Olho esquerdo do Coelho número 6. Não são observadas diferenças morfológicas significantes em relação ao grupo placebo.

As medidas das espessuras das camadas EPR, FR, CNE e CNI, assim como o número de estratos celulares na CNE estão descritos na tabela abaixo (Tabela 12).

Tabela 12. Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo 1.

OLHO	COELHO	ESPESSURA (μm)				CAMADAS
		EPR	FR	CNE	CNI	CNE
1	D	4,4	26,3	31,7	18,3	6
1	E	3,9	38,3	36,3	17,5	6
2	E	2,7	27,4	24,4	15,6	5
5	D	3,8	29,7	24,8	19,7	5
6	E	4,2	39,2	37,5	21,7	7
8	D	3,6	41,4	25,9	16,8	5
9	E	3,4	32,6	26,7	13,9	6
11	E	4,3	31,1	30,7	15,3	6
12	E	3,5	25,7	26,4	16,2	5
14	D	2,8	24,8	22,3	17,1	6

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

4.2.4 Grupo 2

O grupo 2, em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida intra-vítreo, não apresentou diferenças significantes no estudo histológico da retina neurossensorial em relação ao grupo placebo. Não foram percebidas áreas de atrofia da camada de fotorreceptores e da camada nuclear externa compatível lesão de fotorreceptores, nem espessamento significativo das demais camadas sugestivas de edema ou inflamação. Nenhum dos olhos apresentou áreas de descolamento de retina verdadeiro ao exame histológico. (Figura 22).

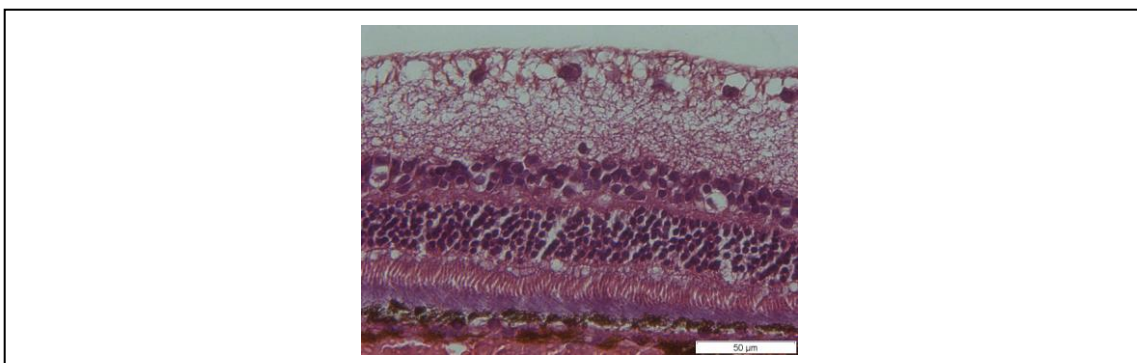


Figura 22: Grupo 2 - Injeção intra-vítreo de 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida - Olho direito do Coelho número 9. Não são observadas diferenças morfológicas significantes em relação ao grupo placebo.

As medidas das espessuras das camadas EPR, FR, CNE e CNI, assim como o número de estratos celulares na CNE estão descritos na tabela abaixo. (Tabela 13).

Tabela 13. Valores das espessuras das camadas de FR, CNE, CNI, EPR e do número de estratos celulares na CNE no grupo 2.

OLHO	COELHO	ESPESSURA (μm)				CAMADAS	
		EPR	FR	CNE	CNI	CNE	
2	D	3,5	25,5	23,4	20,2	5	
3	E	2,7	40,3	25,5	26,5	6	
4	D	2,6	23,6	31,7	15,7	5	
4	E	3,9	21,9	22,9	14,6	5	
6	D	3,4	39,4	33,1	14,2	7	
8	E	4,1	37,4	27,6	17,9	5	
9	D	3,6	26,7	25,4	18,6	6	
10	D	3,3	27,9	23,2	13,7	5	
13	D	2,8	42,1	32,8	18,4	7	
15	D	4,2	30,2	30,3	23,1	6	

Legenda:

D = Olho direito

E = Olho esquerdo

4.2.5 Análise das espessuras das camadas da retina neurosensorial.

As espessuras da camada de fotorreceptores não variou significativamente entre o grupo em que se injetou solução salina balanceada (placebo) e os grupos nos quais se injetaram Sandostatin®; 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida intra-vítreo (grupo 1) e 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida intra-vítreo (grupo 2) (Figura 23).

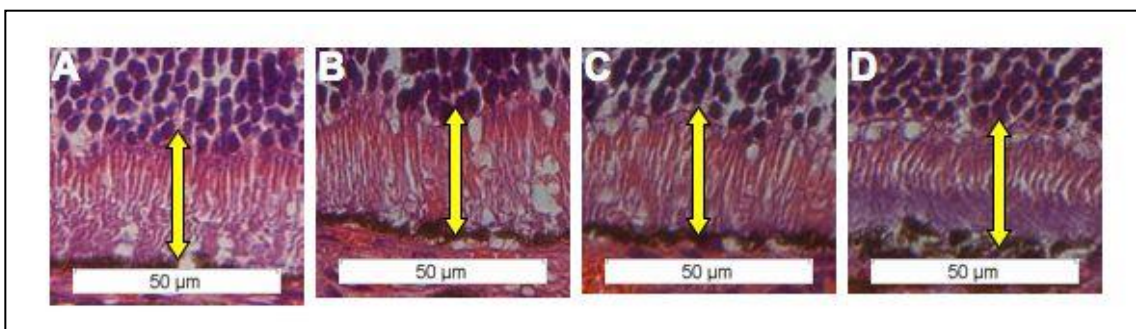


Figura 23: Comparação da espessura da camada de fotorreceptores (seta amarela). **A;** grupo controle, **B;** grupo placebo (solução salina balanceada - BSS), **C;** grupo 1 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida) e **D;** grupo 2 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida). Não se observam diferenças entre os achados histológicos do grupo placebo e dos outros dois grupos.

As espessuras das camadas nucleares externa e interna, assim como o número de estratos celulares na CNE, também não diferiram significativamente entre o grupo que injetou solução salina balanceada (placebo) e os grupos em que foi injetado Sandostatin®; 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida intra-vítreo (grupo 1) e 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida intra-vítreo (grupo 2) (Figura 24).

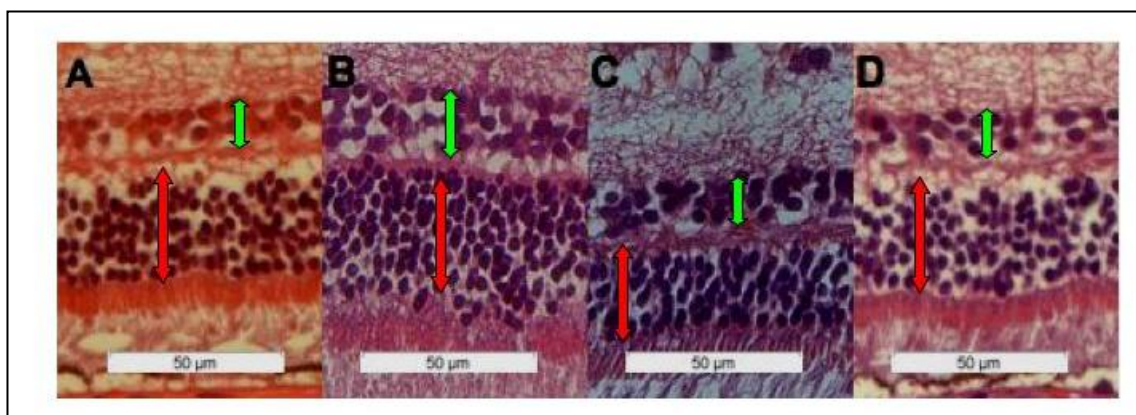


Figura 24: Comparação da espessura da Camada Nuclear Externa (seta vermelha) e da Camada Nuclear Interna (seta verde). **A;** grupo controle, **B;** grupo placebo (solução salina balanceada - BSS), **C;** grupo 1 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida) e **D;** grupo 2 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida). O número de estratos celulares da CNE variou de 5 a 7 estratos nos 4 grupos, não diferindo significativamente entre eles.

Os valores médios das medidas das espessuras das camadas EPR, FR, CNE e CNI, assim como a mediana do número de estratos celulares na CNE dos grupos 1 (0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida) e placebo (solução salina balanceada 0,1ml) estão descritos na tabela abaixo (Tabela 14).

Tabela 14. Comparação das espessuras das camadas de EPR, FR, CNE, CNI e do número de estratos celulares na CNE entre os grupos de controle e placebo e do grupo 1.

GRUPO	ESPESSURA (µm) ¹				CAMADAS CNE ³
	EPR	FR	CNE	CNI	
1*	3,7 ± 0,6	31,6 ± 6,1	28,7 ± 5,2	17,2 ± 2,3	6,0
PLACEBO	3,7 ± 0,5	28,5 ± 3,6	27,5 ± 3,2	18,3 ± 2,6	5,5
Valor de p	0,74 ²	0,18 ²	0,56 ²	0,35 ²	0,71 ⁴

Legenda:

1 - Medida em micrometros ± Desvio-Padrão (DP)

2 - Teste t de Student para amostra pareadas

3 - Mediana do número de camadas celulares da CNE (Distância Inter-quartilica)

4 - Teste de Wilcoxon

* - Grupo em que foi injetado 0,1 mg/ml de Sandostatin

Os valores médios das medidas das espessuras das camadas EPR, FR, CNE e CNI, assim como a mediana do número de estratos celulares na CNE dos grupos 2 (0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida) e placebo (solução salina balanceada) estão descritos na tabela abaixo (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação das espessuras das camadas de EPR, FR, CNE, CNI e do número de estratos celulares na CNE entre o grupo placebo e o grupo 2.

GRUPO	ESPESSURA (μm) ¹				CAMADAS CNE ³
	EPR	FR	CNE	CNI	
2*	3,4 \pm 0,6	31,5 \pm 7,6	27,6 \pm 4,1	18,3 \pm 4,1	5,5
PLACEBO	3,7 \pm 0,5	28,5 \pm 3,6	27,5 \pm 3,2	18,3 \pm 2,6	5,5
Valor de p	0,18 ²	0,27 ²	0,97 ²	0,98 ²	0,84 ⁴

Legenda:

- 1 - Medida em micrometros Desvio-Padrão (DP)
- 2 - Teste t de Student para amostra pareadas
- 3 - Valor mediano do número de camadas celulares da CNE (Distância Inter-quartílica)
- 4 - Calculado pelo teste de Wilcoxon
- * - Grupo em que foi injetado 0,5 mg/ml de Sandostatin

4.2.6 Análise do epitélio pigmentado da retina.

Nos grupos placebo, grupo 1 e grupo 2, o EPR **apresentou-se** de aspecto contínuo, com ausência de descolamento de retina verdadeiro, sem áreas sugestivas de atrofia e sem diferenças significantes entre eles (Figura 25).

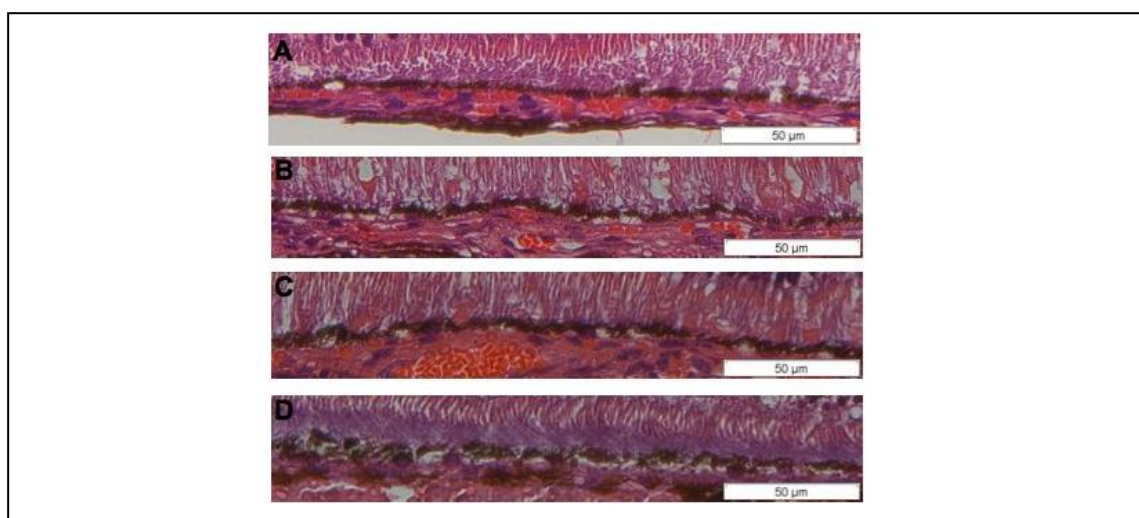


Figura 25: Fotos do EPR representativas dos quatro grupos de estudo. **A;** grupo controle, **B;** grupo placebo (solução salina balanceada - BSS), **C;** grupo 1 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida) e **D;** grupo 2 (0,1ml intra-vítreo da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida). Não foi observada diferença significativa no aspecto contínuo entre os grupos.

A espessura média do EPR também não variou significativamente entre os grupos (Tabela 16).

Tabela 16. Comparação das espessuras do EPR entre o grupo placebo e os grupos 1 e 2

GRUPOS	ESPESSURA DO EPR (μm) (MÉDIA DP)	p
PLACEBO	3,7 \pm 0,5	---
GRUPO 1 (0,1mg/ml Sandostatin)	3,7 \pm 0,6	0,74 ¹
GRUPO 2 (0,5mg/ml Sandostatin)	3,4 \pm 0,6	0,18 ²

Legenda:

p - Valor de p calculado pelo teste t student para amostras pareadas

1 - Valor de p calculado pela comparação entre os grupos 1 e placebo

2 - Valor de p calculado pela comparação entre os grupos 2 e placebo

5 DISCUSSÃO

5.1 Discussão da metodologia

Optou-se por estudo prospectivo, experimental em animais, placebo-controlado, visando analisar a toxicidade da retina neuro sensorial e do EPR após injeção intra-vítrea de Octreotida (Sandostatin®) em coelhos não albinos.

O tipo de animal escolhido no estudo foi baseado em trabalhos prévios de toxicidade da retina onde coelhos foram escolhidos pelo seu porte, facilidade de acesso ao globo ocular, fácil manejo, resistência, custo e relativa semelhança em anatomia ao olho humano. O motivo da escolha sobre animais não albinos recai sobre a importância da pigmentação (EPR) na formação de uma boa acuidade visual.^{206, 224-229}

O tamanho da amostra no presente estudo foi calculado em número de olhos e animais, para o poder do estudo ser de pelo menos 90% e com nível de significância de 0,05. Seriam necessários um mínimo de 4,36 animais por grupo, que arredondando-se para o próximo número inteiro ficou estabelecido e liberado 5 animais por grupo (total de 20 indivíduos - 40 olhos) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Apesar de estudos experimentais em animais necessitar de relativa pequena amostragem, pois cobaias apresentam variabilidade pequena, neste estudo tivemos que utilizar ambos os sexos de coelhos, mesclados aleatoriamente nos quatro grupos, devido a dificuldade de conseguir indivíduos do mesmo sexo, com peso e idades semelhantes sendo não albinos.

Os cuidados com os animais foi baseado no estatuto para uso de animais em pesquisas da visão e oftalmologia da *Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO*.²²¹ O volume de droga injetado (0,1ml), assim como, a distância do limbo e local onde a injeção deveria ser realizada foi baseada inicialmente no único estudo publicado em que utilizou octreotida (Sandostatin®) intra-vítrea em coelhos realizado por Liang *et al.*²³⁰

5.2 A injeção intra-vítrea em olhos de coelhos não albinos

O *Endophthalmitis Vitrectomy Study* (EVS) com seus resultados publicados em 1995 e o advento da terapia anti-angiogênica popularizaram a realização das injeções intra-vítreas no tratamento de diversas patologias oftalmológicas antes bastante desafiadoras. As injeções são amplamente utilizadas na atualidade e as indicações vão desde infecções, passando pelos edemas de retina, até diferentes etiologias de neovascularização ocular. Apesar de se mostrarem seguras, existem relatos de complicações e o uso de anti-angiogênicos na oftalmologia devem seguir os protocolos rígidos de segurança e da boa prática clínica.^{223, 231-235}

Fung *et al.* realizaram pesquisa que incluiu oftalmologistas de doze países em quatro continentes, coletando dados referentes a 7.113 injeções intra-vítreas com uma média de três meses de acompanhamento e encontraram incidência de endoftalmite de 0,01% e descolamento de retina de 0,04%, entretanto, consideraram os efeitos adversos sistêmicos inerentes à própria idade do paciente. Estudando o uso de Bevacizumabe e Ranibizumabe intra-vítreo, Fintak *et al.* avaliaram 14.320 injeções e encontraram a incidência de 0,02% de endoftalmite. Acredita-se que a experiência acumulada, a adequada anti-sepsia e a adequação de normas para injeção intra-vítrea tenham levado a uma importante redução de endoftalmite associada ao procedimento.²²³ Angulo Bocco *et al.* avaliaram 2.028 injeções realizadas com Triancinolona, Pegaptanibe e Ranibizumabe e corroboraram os achados dos demais estudos. Eles ainda encontraram a incidência de 0,44% de catarata e 0,05% de rotura retiniana.^{232, 233, 235}

No presente estudo, o procedimento de injeção intra-vítrea em olhos de coelhos não revelou efeitos clínicos adversos relevantes no pós-operatório. A presença de opacificação cristalínica localizada próximo ao sítio da injeção foi ocasionada, possivelmente, pelo toque cristalínico durante o procedimento, pois em comparação anatômica a lente do coelho ocupa mais espaço que o cristalino humano, o que aumenta o risco de toque, e formação de catarata iatrogênica.²⁰² Esta opacificação local, no entanto, não impediu o adequado acompanhamento da retina dos animais estudados.

O edema de córnea, surgido logo após a injeção, foi secundário ao aumento brusco da pressão intra-ocular, por aumento de volume no segmento vítreo. O volume da cavidade vítrea do olho do coelho é de aproximadamente 1,7ml, enquanto o do olho humano é de 4ml. O volume injetado no olho do animal foi baseado em estudos prévios com coelhos e naquele que é injetado no ser humano, ou seja, proporcionalmente 2,5 vezes maior. Corrobora com o fato do aparecimento do edema de córnea em 100% dos animais estudados a ausência da membrana de Bowman em córnea de coelhos, camada esta que confere estrutura e proteção.²⁰²

Foi levantada, ainda, na fase do estudo piloto do trabalho, a possibilidade deste volume maior ser responsável por danos estruturais à retina neurossensorial e epitélio pigmentado da retina (EPR) por possível aumento da pressão intra-ocular (PIO) e tais ocorridos poderiam ser falsamente atribuídos à droga em estudo (Octreotida). A análise histológica cuidadosa dos olhos que não realizaram injeção (grupo controle) e dos olhos que realizaram injeção de placebo (0,1ml de solução salina balanceada) mostrou que esta injeção de 0,1ml não leva a danos estruturais a retina e EPR de olhos de coelhos. A PIO já estava normalizada 48 horas após o procedimento.

A verificação da existência de permeabilidade da artéria central da retina com oftalmoscopia binocular indireta, após a injeção, também confirmou a ausência da possibilidade de dano isquêmico secundário à injeção.

Não houve, ainda, nenhum caso de endoftalmite e de inflamação ocular grave usando-se os cuidados recomendados pela melhor prática clínica hoje existente para injeções intra-vítreas, conforme adotado pelo protocolo deste trabalho.

Os dados do estudo sugerem que a injeção intra-vítrea de 0,1ml em olhos de coelhos, sob condições de assepsia e anti-sepsia adequadas, seja um procedimento clinicamente seguro, podendo ser considerado útil e reproduzível em modelos experimentais para pesquisa sobre toxicidade retiniana de diferentes fármacos em experimentos animais.

5.3 Os efeitos da Octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não albinos.

5.3.1 A análise da retina neurosensorial

Neste estudo, composto de vinte coelhos não albinos, 10 olhos de cinco coelhos foram enucleados no início do estudo para compor o Grupo controle, trinta olhos dos outros coelhos não albinos receberam injeção intra-vítrea de 0,1ml e foram distribuídos em três grupos (1:1:1), sem diferenças significantes de sexo e peso (Tabela 7), nos quais foram injetados: solução salina balanceada (Grupo placebo), 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida (Grupo 1) e 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida (Grupo 2). Os olhos dos animais foram acompanhados por noventa dias e só então foram enucleados e preparados para avaliação histológica.

Por possuir o olho consideravelmente maior que o dos camundongos, o que proporciona injeções intra-vitreas com volume semelhante as realizadas em seres humanos, e pela maior facilidade em mantê-los em ambientes experimentais, entre outras características, o custo, manuseio e resistência quando comparados aos suínos e primatas, os coelhos vêm sendo usados como modelo animal experimental ideal na investigação da toxicidade retiniana de diferentes fármacos e outras pesquisas na oftalmologia.^{206, 207, 217, 219, 236, 237}

Komarowska *et al.* relataram alteração histológica descrita como afinamento de todas as camadas da retina, relacionada à lesão tóxica por repetidas injeções de Ceterolaco na cavidade vítrea de nove coelhos albinos, surgidas após doze semanas de acompanhamento.²¹⁹ Maia *et al.* detectaram toxicidade retiniana a nível histológico após o uso de Indocianina verde na cavidade vítrea de olhos de coelhos pigmentados pela presença de edema nas camadas celulares, chegando até o nível dos fotorreceptores.^{237, 238}

Bakri *et al.* mostraram não haver toxicidade histológica sobre a retina após aplicação intra-vítrea de *Nanogold* em dezesseis coelhos pigmentados. Estes autores encontraram apenas vacuolização leve nas camadas de células

ganglionares e plexiforme interna, tanto no grupo controle como no grupo do estudo, e atribuíram tal achado a artefato de preparação das peças.²³⁹

A toxicidade do Bevacizumabe sobre a retina também vem sendo testada. Luthra *et al.* e Kaempf *et al.* mostraram *in vitro* que uma concentração cinco vezes maior que a usada clinicamente não é tóxica para os fotorreceptores.^{240, 241}

In vivo, Manzano *et al.* e Feiner *et al.* publicaram os primeiros estudos experimentais com análise histológica mostrando a ausência da toxidade do Bevacizumabe intra-vítreo em olhos de coelhos albinos. Sancho-Tello *et al.* mostraram a presença de discreta inflamação transitória após a aplicação de Bevacizumabe intra-vítreo em olhos de ratos. Cheng *et al.* não detectaram toxicidade do Bevacimabe intra-vítreo *in vivo* e *in vitro* sobre as células ganglionares da retina, mesmo após injeções repetidas em altas doses. Todos esses estudos, publicados na literatura mundial, apresentam tempo de acompanhamento de no máximo quatro semanas após a injeção intra-vítrea de Avastin®.^{219, 242-245}

Komarowska *et al.* só detectaram alterações de atrofia da retina com o uso de Ceterolaco após doze semanas, logo alterações tóxicas relativas ao Octreotida, Bevacizumabe ou a qualquer outro fármaco também poderiam surgir num longo prazo.²¹⁹

Como se pode notar, são inúmeras as pesquisas básicas de fármacos para uso ocular e o coelho têm se tornado importante modelo experimental.

Com relação ao Octreotida pode-se afirmar segundo Liang *et al.* que em doses até 1mg as alterações são ausentes, nas dosagens de 2mg e 5mg intra-vítreas há sinais de inflamação e alterações histológicas compatíveis com dano tecidual da retina e diminuição da amplitude da onda-b na eletroretinografia, provocado por alguma lesão a nível de neuroretina.²³⁰

No presente estudo, foi proposto um tempo de acompanhamento maior em comparação ao estudo de Liang *et al.* a fim de avaliar possíveis efeitos tóxicos tardios. Após noventa dias de seguimento, não foram encontradas

diferenças morfológicas entre a análise histológica dos olhos do Grupo controle, Grupo placebo (BSS), Grupo 1 (grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida intra-vítreo) e Grupo 2 (grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida intra-vítreo

Além da análise morfológica, de forma inédita na literatura mundial, foi realizada a medida das espessuras das camadas retinianas para possibilitar uma avaliação comparativa-quantitativa e detectar possíveis sinais de atrofia ou edema dos estratos celulares da retina, que poderiam associar-se à toxicidade pela injeção intra-vítrea do Sandostatin®.

Foi visto que o valor médio da espessura da camada de fotorreceptores (Figura 28), das camadas nucleares externa e interna, assim como o número de estratos celulares na CNE (Figura 29) não diferem significativamente entre os olhos que realizaram injeção intra-vítrea de solução salina balanceada – Grupo placebo e os olhos que realizaram injeção intra-vítrea de Octreotida 0,1mg/ml – Grupo 1 (Tabela 14) ou Octreotida 0,5mg/ml – Grupo 2 (Tabela 15).

Diante da análise morfo-histológica e quantitativa da espessura das camadas, sugere-se que não houve lesão seguida de perda celular com conseqüente atrofia da camada, como relatado por Komarowska *et al.* após o uso de Cetorolaco, nem tão pouco, edema retiniano como referido por Maia *et al.* após uso de indocianina verde.^{219, 237, 238}

Pode-se considerar, então, que a injeção intra-vítrea de 0,1ml de Octreotida das apresentações de 0,1mg/ml ou 0,5mg/ml não leva a efeitos tóxicos sobre a retina neurossensorial de olhos de coelhos não albinos, sugerindo ser o uso de Sandostatin® seguro na posologia utilizada e com o volume comumente utilizado na prática oftalmológica.

5.3.2 A análise do epitélio pigmentado da retina

Liang *et al.* em pesquisa sobre toxicidade retiniana utilizando Octreotida no vítreo de coelhos albinos, demonstrou que não há alterações histológicas de retina ou eletroretinográficas quando a dosagem aplicada no vítreo é igual ou menor que 1mg. As doses de 2mg e 5mg intra-vítreas neste

mesmo estudo apresentaram catarata, alterações histológicas compatíveis com dano tecidual com presença de macrófagos e infiltrados de monócitos, e na eletroretinografia diminuição da amplitude da onda-b, que é relacionado com alguma lesão a nível de neuroretina.²³⁰

Outro estudo conduzido por Robertson *et al.* utilizando Octreotida, desta vez, de longa ação (Sandostatin® LAR) em olhos de gatos e coelhos verificou que doses de 1.1mg ou menores não provocam quaisquer tipos de reações adversas, entretanto, doses mais elevadas se mostraram significativamente tóxicas, incluindo catarata e rubeosis. Nos testes específicos concluiu-se que o Octreotide de longa ação possui alta concentração da droga associado a um pico no dia 28, no dia 42 volta a ter níveis iguais ao dia 14. Portanto, acredita-se que o Octreotide pode inibir progressão de retinopias e angiogênese por longo período de dias e se tornar excelente arma terapêutica. Sprau *et al.* demonstraram que a Octreotida, assim como, a Talidomida inibem a migração e proliferação das células do EPR *in vitro* e são antiangiogênicas. Há a necessidade de mais estudos comprobatórios para início do uso em seres humanos.^{177, 246}

Não há publicações sobre o uso de análogos sintéticos da somatostatina no espaço intra-vítreo com coelhos não albinos. O EPR é primordial na formação visual, o que demonstra a importância de se testar novas drogas utilizando cobaias experimentais com pigmento. Poucos estudos na literatura mundial usaram coelhos pigmentados para testar a toxicidade retiniana, a maioria testou drogas antiangiogênicas com acompanhamento máximo de quatro semanas.^{247, 248} Tanto o estudo de Robertson *et al.* e Liang *et al.*, os mais importantes publicados que utilizaram coelhos e Octreotida, os coelhos utilizados eram albinos, portanto sem pigmento. Este fato corrobora com a qualidade e originalidade do presente estudo, sendo pioneiro na utilização de animais com pigmento em testes de toxicidade da retina com drogas intra-vitreas.

No presente estudo houve um tempo de observação mais longo, com destaque na avaliação e atenção dada ao epitélio pigmentado da retina para se avaliar possíveis efeitos tóxicos tardios (noventa dias após o procedimento) do

Sandostatin®. Nos coelhos não albinos do estudo, a análise minuciosa do epitélio pigmentado da retina nos olhos submetidos à injeção do Grupo placebo (BSS), Grupo 1 (grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,1mg/ml de Octreotida intra-vítreo) e Grupo 2 (grupo em que foi injetado 0,1ml da apresentação de 0,5mg/ml de Octreotida intra-vítreo) não mostrou diferenças significantes entre eles e houve preservação de seu aspecto morfológico contínuo (Figura 30). A medida de sua espessura é extremamente importante para avaliar sinais de atrofia. Não foi observada diferença significativa desta medida entre os grupos (Tabela 16).

Sugere-se, portanto, que injeções intra-vitreas de Octreotida nas concentrações de 0,1mg/ml e de 0,5mg/ml não levem a danos e muito menos a atrofia na camada de epitélio pigmentar da retina.

5.4 Perspectivas futuras

Este trabalho mostrou a segurança da injeção intra-vítrea de Octreotida, uma droga de custo acessível, que bloqueia outra fonte responsável pela angiogênese (que não é o VEGF e sim o GH e IGF-1), e poderá servir como nova arma terapêutica, através de monoterapia ou terapia combinada, no tratamento das diversas doenças proliferativas da retina e coróide. Projeta-se, agora, a construção de protocolos de trabalhos de pesquisa para avaliação de sua eficácia em larga série de pacientes.

Após este estudo, detalhado e bem sucedido na sua construção e desenvolvimento de um modelo animal reprodutível e seguro para realização de injeções intra-vitreas em ambiente experimental, utilizando indivíduos não albinos, que apresentam mais semelhança a estrutura anatômica normal da retina humana, espera-se, agora, utilizá-lo em futuros trabalhos a fim de testar novas drogas a serem utilizadas no tratamento das doenças neovasculares do olho.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusão principal

- a. A injeção intra-vítrea de 0,1ml com 0,1mg/ml e 0,5mg/ml de Octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não-albinos é segura e não apresentaram toxicidade ocular ou alterações histológicas nos olhos estudados.

6.2 Conclusões secundárias

- a. O volume de 0,1ml de solução salina balanceada injetada na cavidade vítrea de olhos de coelhos não-albinos não acarretou alterações histológicas e danos estruturais a retina neurosensorial e epitélio pigmentado da retina.
- b. A injeção intra-vítrea de Octreotida (Sandostatin®) em olhos de coelhos não-albinos não foi associada a complicações oftalmológicas pós-operatórias significativas.
- c. A injeção intra-vítrea de 0,1ml com 0,1mg/ml e 0,5mg/ml de Octreotida (Sandostatin® - apresentação comercial disponível) em olhos de coelhos não-albinos mostrou-se segura e sem sinais de danos histológicos a retina neurosensorial após três meses.
- d. A injeção intra-vítrea de 0,1ml com 0,1mg/ml e 0,5mg/ml de Octreotida em olhos de coelhos não-albinos mostrou-se segura e sem sinais de danos histológicos ao epitélio pigmentado da retina após um seguimento de três meses.

7 REFERÊNCIAS

1. Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 2007;52 Suppl 1:S3-19.
2. Bressler SB. Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2009;116(10 Suppl):S1-7.
3. Bressler NM, Bressler SB, Congdon NG, et al. Potential public health impact of Age-Related Eye Disease Study results: AREDS report no. 11. *Arch Ophthalmol* 2003;121(11):1621-4.
4. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2008;358(24):2606-17.
5. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122(4):477-85.
6. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122(4):564-72.
7. Pascolini D, Mariotti SP, Pokharel GP, et al. 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol* 2004;11(2):67-115.
8. Rodriguez-Fontal M, Kerrison JB, Alfaro DV, Jablon EP. Metabolic control and diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009;5(1):3-7.
9. Liew G, Mitchell P, Wong TY. Systemic management of diabetic retinopathy. *Bmj* 2009;338:b441.
10. Abuissa H, Bel DS, O'Keefe J H, Jr. Strategies to prevent type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin* 2005;21(7):1107-14.
11. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992;15(11):1509-16.
12. Escario PH, Arantes TE, Figueiroa Filho NC, et al. [Epidemiology and regional differences of diabetic retinopathy in Pernambuco, Brazil]. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71(2):172-5.

13. Gilbert C. Retinopathy of prematurity: a global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control. *Early Hum Dev* 2008;84(2):77-82.
14. Rubinstein A, Alcocer L, Chagas A. High blood pressure in Latin America: a call to action. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2009;3(4):259-85.
15. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2009.
16. Lee DE, Cooper RS. Recommendations for global hypertension monitoring and prevention. *Curr Hypertens Rep* 2009;11(6):444-9.
17. Remky H, Amalric P. [History of photosturgery of the eye]. *Gesnerus* 1990;47 Pt 1:67-81.
18. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* 1981;88(7):583-600.
19. Four risk factors for severe visual loss in diabetic retinopathy. The third report from the Diabetic Retinopathy Study. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Arch Ophthalmol* 1979;97(4):654-5.
20. Tasman W, Magargal LE, Augsburger JJ. Effects of argon laser photocoagulation on rubeosis iridis and angle neovascularization. *Ophthalmology* 1980;87(5):400-2.
21. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 2000;50(1-2):1-15.
22. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004;117:3-32.
23. Miller JW, Adamis AP, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev* 1997;13(1):37-50.
24. Kvanta A. Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(3):282-8.
25. Ruiter DJ, Schlingemann RO, Westphal JR, et al. Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. *Behring Inst Mitt* 1993(92):258-72.
26. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998;4(3):336-40.
27. Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest* 2001;107(4):409-17.

28. Kiefer FN, Neysari S, Humar R, et al. Hypertension and angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2003;9(21):1733-44.
29. Ashton N. Oxygen and the retinal blood vessels. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1980;100(3):359-62.
30. Kretzer FL, Hittner HM. Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development. *Arch Dis Child* 1988;63(10 Spec No):1151-67.
31. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994;145(3):574-84.
32. Argon laser scatter photocoagulation for prevention of neovascularization and vitreous hemorrhage in branch vein occlusion. A randomized clinical trial. Branch Vein Occlusion Study Group. *Arch Ophthalmol* 1986;104(1):34-41.
33. Aiello LM, Wand M, Liang G. Neovascular glaucoma and vitreous hemorrhage following cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *Ophthalmology* 1983;90(7):814-20.
34. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: the second report of diabetic retinopathy study findings. *Ophthalmology* 1978;85(1):82-106.
35. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003;48(3):257-93.
36. Missotten T, Baarsma GS, Kuijpers RW, et al. Somatostatin-related therapeutics in ophthalmology: a review. *J Endocrinol Invest* 2005;28(11 Suppl International):118-26.
37. Emerson MV, Lauer AK. Emerging therapies for the treatment of neovascular age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *BioDrugs* 2007;21(4):245-57.
38. Sherris D. Ocular drug development--future directions. *Angiogenesis* 2007;10(2):71-6.
39. Ahmadi MA, Lim JI. Pharmacotherapy of age-related macular degeneration. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9(17):3045-52.
40. Beutel J, Rudolf M, Grisanti S. Current and future therapies for age-related macular degeneration. *Expert Opin Emerg Drugs* 2009;14(2):341-62.
41. Bressler NM. Antiangiogenic approaches to age-related macular degeneration today. *Ophthalmology* 2009;116(10 Suppl):S15-23.

42. Tolentino MJ. Current molecular understanding and future treatment strategies for pathologic ocular neovascularization. *Curr Mol Med* 2009;9(8):973-81.
43. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
44. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000;184(3):301-10.
45. Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(6):721-48.
46. Engerman RL, Pfaffenbach D, Davis MD. Cell turnover of capillaries. *Lab Invest* 1967;17(6):738-43.
47. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995;113(12):1538-44.
48. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J, et al. Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(2):385-90.
49. Sengupta N, Caballero S, Mames RN, et al. The role of adult bone marrow-derived stem cells in choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(11):4908-13.
50. Champion J. Laser safety management. *Br J Perioper Nurs* 2000;10(8):428-32.
51. L'Esperance FA, Jr. The treatment of ophthalmic vascular disease by argon laser photocoagulation. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1969;73(6):1077-96.
52. Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Am J Ophthalmol* 1976;81(4):383-96.
53. Kiernan DF, Mieler WF. The use of intraocular corticosteroids. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10(15):2511-25.
54. A randomized trial comparing intravitreal triamcinolone acetonide and focal/grid photocoagulation for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2008;115(9):1447-9, 9 e1-10.
55. Ip MS, Bressler SB, Antoszyk AN, et al. A randomized trial comparing intravitreal triamcinolone and focal/grid photocoagulation for diabetic macular edema: baseline features. *Retina* 2008;28(7):919-30.

56. Beck RW, Edwards AR, Aiello LP, et al. Three-year follow-up of a randomized trial comparing focal/grid photocoagulation and intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 2009;127(3):245-51.
57. Scott IU, Ip MS, VanVeldhuisen PC, et al. A randomized trial comparing the efficacy and safety of intravitreal triamcinolone with standard care to treat vision loss associated with macular Edema secondary to branch retinal vein occlusion: the Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE) study report 6. *Arch Ophthalmol* 2009;127(9):1115-28.
58. Kuno N, Fujii S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date. *Drugs Aging*;27(2):117-34.
59. Augustin AJ, Offermann I. Combination therapy for choroidal neovascularisation. *Drugs Aging* 2007;24(12):979-90.
60. Augustin AJ, Puls S, Offermann I. Triple therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration: verteporfin PDT, bevacizumab, and dexamethasone. *Retina* 2007;27(2):133-40.
61. Augustin A. Triple therapy for age-related macular degeneration. *Retina* 2009;29(6 Suppl):S8-11.
62. Bakri SJ, Couch SM, McCannel CA, Edwards AO. Same-day triple therapy with photodynamic therapy, intravitreal dexamethasone, and bevacizumab in wet age-related macular degeneration. *Retina* 2009;29(5):573-8.
63. Yip PP, Woo CF, Tang HH, Ho CK. Triple therapy for neovascular age-related macular degeneration using single-session photodynamic therapy combined with intravitreal bevacizumab and triamcinolone. *Br J Ophthalmol* 2009;93(6):754-8.
64. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. *Arch Ophthalmol* 1999;117(10):1329-45.
65. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization--verteporfin in photodynamic therapy report 2. *Am J Ophthalmol* 2001;131(5):541-60.
66. Blinder KJ, Blumenkranz MS, Bressler NM, et al. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia: 2-year results of a randomized clinical trial--VIP report no. 3. *Ophthalmology* 2003;110(4):667-73.

67. Mennel S, Barbazetto I, Meyer CH, et al. Ocular photodynamic therapy--standard applications and new indications (part 1). Review of the literature and personal experience. *Ophthalmologica* 2007;221(4):216-26.
68. Besozzi G, Sborgia L, Furino C, et al. Low-fluence-rate photodynamic therapy to treat subfoveal choroidal neovascularization in pathological myopia. A study of efficacy and safety. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*;248(4):497-502.
69. Costagliola C, Romano MR, Rinaldi M, et al. Low fluence rate photodynamic therapy combined with intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*;94(2):180-4.
70. Kovacs KD, Quirk MT, Kinoshita T, et al. A retrospective analysis of triple combination therapy with intravitreal bevacizumab, posterior sub-tenon's triamcinolone acetonide, and low-fluence verteporfin photodynamic therapy in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina*;31(3):446-52.
71. Reibaldi M, Boscia F, Avitabile T, et al. Functional Retinal Changes Measured by Microperimetry in Standard-Fluence vs Low-Fluence Photodynamic Therapy in Chronic Central Serous Chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol*.
72. Reibaldi M, Cardascia N, Longo A, et al. Standard-fluence versus low-fluence photodynamic therapy in chronic central serous chorioretinopathy: a nonrandomized clinical trial. *Am J Ophthalmol*;149(2):307-15 e2.
73. Arias L, Pujol O, Rubio M, Caminal J. Long-term results of photodynamic therapy for the treatment of choroidal neovascularization secondary to angioid streaks. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(6):753-7.
74. Atebara NH. Retinal capillary hemangioma treated with verteporfin photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 2002;134(5):788-90.
75. Barbazetto I, Schmidt-Erfurth U. Photodynamic therapy of choroidal hemangioma: two case reports. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238(3):214-21.
76. Barbazetto IA, Lee TC, Abramson DH. Treatment of conjunctival squamous cell carcinoma with photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 2004;138(2):183-9.
77. Barbazetto IA, Lee TC, Rollins IS, et al. Treatment of choroidal melanoma using photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 2003;135(6):898-9.
78. Boscia F, Furino C, Sborgia L, et al. Photodynamic therapy for retinal angiomatous proliferations and pigment epithelium detachment. *Am J Ophthalmol* 2004;138(6):1077-9.

79. Ergun E, Tittl M, Stur M. Photodynamic therapy with verteporfin in subfoveal choroidal neovascularization secondary to central serous chorioretinopathy. *Arch Ophthalmol* 2004;122(1):37-41.
80. Hussain N, Das T, Sumasri K, Ram LS. Bilateral sequential photodynamic therapy for sub-retinal neovascularization with type 2A parafoveal telangiectasis. *Am J Ophthalmol* 2005;140(2):333-5.
81. Ladd BS, Solomon SD, Bressler NM, Bressler SB. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization in patients with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2001;132(5):659-67.
82. Lee SC, Seong YS, Kim SS, et al. Photodynamic therapy with verteporfin for polypoidal choroidal vasculopathy of the macula. *Ophthalmologica* 2004;218(3):193-201.
83. Mennel S, Barbazetto I, Meyer CH, et al. Ocular photodynamic therapy--standard applications and new indications. Part 2. Review of the literature and personal experience. *Ophthalmologica* 2007;221(5):282-91.
84. Spaide RF, Martin ML, Slakter J, et al. Treatment of idiopathic subfoveal choroidal neovascular lesions using photodynamic therapy with verteporfin. *Am J Ophthalmol* 2002;134(1):62-8.
85. Wachtlin J, Heimann H, Behme T, Foerster MH. Long-term results after photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularizations secondary to inflammatory chorioretinal diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241(11):899-906.
86. Webster AR, Maher ER, Moore AT. Clinical characteristics of ocular angiomas in von Hippel-Lindau disease and correlation with germline mutation. *Arch Ophthalmol* 1999;117(3):371-8.
87. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(23):10457-61.
88. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84(5):1470-8.
89. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 1989;264(33):20017-24.
90. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246(4935):1309-12.

91. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol* 2002;120(3):338-46.
92. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246(4935):1306-9.
93. Michaelson IC. Vascular morphogenesis in the retina of the cat. *J Anat* 1948;82(Pt 3):167-74 4.
94. Miller JW. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am J Pathol* 1997;151(1):13-23.
95. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *Embo J* 1989;8(12):3801-6.
96. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219(4587):983-5.
97. Frank RN, Amin RH, Elliott D, et al. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 1996;122(3):393-403.
98. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, et al. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol* 1997;81(2):154-62.
99. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(9):1929-34.
100. Otani A, Takagi H, Oh H, et al. Vascular endothelial growth factor family and receptor expression in human choroidal neovascular membranes. *Microvasc Res* 2002;64(1):162-9.
101. Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina* 2005;25(2):111-8.
102. Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 2006;90(12):1542-7.
103. Rahimi N. Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Exp Eye Res* 2006;83(5):1005-16.
104. Ruckman J, Green LS, Beeson J, et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular

permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1998;273(32):20556-67.

105. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 2002;22(2):143-52.

106. Barakat MR, Kaiser PK. VEGF inhibitors for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(5):637-46.

107. Chakravarthy U, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., et al. Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113(9):1508 e1-25.

108. D'Amico DJ, Masonson HN, Patel M, et al. Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: two-year safety results of the two prospective, multicenter, controlled clinical trials. *Ophthalmology* 2006;113(6):992-1001 e6.

109. Singerman LJ, Masonson H, Patel M, et al. Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: third-year safety results of the VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation (VISION) trial. *Br J Ophthalmol* 2008;92(12):1606-11.

110. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004;351(27):2805-16.

111. Reddy GK. The addition of bevacizumab to FOLFOX4 prolongs survival in relapsed colorectal cancer: interim data from the ECOG 3200 trial. *Clin Colorectal Cancer* 2005;4(5):300-1.

112. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112(6):1035-47.

113. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36(4):331-5.

114. Chappelov AV, Kaiser PK. Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies. *Drugs* 2008;68(8):1029-36.

115. Arraes JC, Tedesco RC, Arraes TA, et al. Intravitreal bevacizumab in pigmented rabbit eyes: histological analysis 90 days after injection. *Arq Bras Oftalmol* 2009;72(5):656-60.

116. Dadgostar H, Waheed N. The evolving role of vascular endothelial growth factor inhibitors in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* 2008;22(6):761-7.
117. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol* 2006;142(4):660-8.
118. Chang TS, Kokame G, Casey R, et al. Short-term effectiveness of intravitreal bevacizumab versus ranibizumab injections for patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2009;29(9):1235-41.
119. Gamulescu MA, Radeck V, Lustinger B, et al. Bevacizumab versus ranibizumab in the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol*;30(3):261-6.
120. Schmucker C, Loke YK, Ehken C, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) versus ranibizumab (Lucentis) for the treatment of age-related macular degeneration: a safety review. *Br J Ophthalmol*;95(3):308-17.
121. Shah AR, Del Priore LV. Duration of action of intravitreal ranibizumab and bevacizumab in exudative AMD eyes based on macular volume measurements. *Br J Ophthalmol* 2009;93(8):1027-32.
122. Sawada O, Kawamura H, Kakinoki M, et al. Vascular endothelial growth factor in aqueous humor before and after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2007;125(10):1363-6.
123. Curtis LH, Hammill BG, Schulman KA, Cousins SW. Risks of mortality, myocardial infarction, bleeding, and stroke associated with therapies for age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*;128(10):1273-9.
124. Moshfeghi AA, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twenty-four-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2006;113(11):2002 e1-12.
125. Prasad PS, Schwartz SD, Hubschman JP. Age-related macular degeneration: current and novel therapies. *Maturitas*;66(1):46-50.
126. Steinbrook R. The price of sight--ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355(14):1409-12.
127. Donati G. Emerging therapies for neovascular age-related macular degeneration: state of the art. *Ophthalmologica* 2007;221(6):366-77.
128. Kim KJ, Li B, Houck K, et al. The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 1992;7(1):53-64.

129. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997;57(20):4593-9.
130. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355(14):1432-44.
131. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 2009;116(1):57-65 e5.
132. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355(14):1419-31.
133. Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 1999;27(5):536-44.
134. Jackson TL, Antcliff RJ, Hillenkamp J, Marshall J. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):2141-6.
135. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, et al. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(2):726-33.
136. Rosenfeld PJ, Schwartz SD, Blumenkranz MS, et al. Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2005;112(6):1048-53.
137. Campochiaro PA, Heier JS, Feiner L, et al. Ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study. *Ophthalmology*;117(6):1102-12 e1.
138. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, et al. The RESTORE Study Ranibizumab Monotherapy or Combined with Laser versus Laser Monotherapy for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology*;118(4):615-25.
139. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, et al. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* 2003;9(1):47-52.
140. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(17):11393-8.
141. Konner J, Dupont J. Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer* 2004;4 Suppl 2:S81-5.

142. Gelisken O, Yazici B. Radiation therapy in exudative age-related macular degeneration. *Semin Ophthalmol* 1999;14(1):27-34.
143. Avila MP, Farah ME, Santos A, et al. Twelve-month short-term safety and visual-acuity results from a multicentre prospective study of epiretinal strontium-90 brachytherapy with bevacizumab for the treatment of subfoveal choroidal neovascularisation secondary to age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2009;93(3):305-9.
144. Avila MP, Farah ME, Santos A, et al. Twelve-month safety and visual acuity results from a feasibility study of intraocular, epiretinal radiation therapy for the treatment of subfoveal CNV secondary to AMD. *Retina* 2009;29(2):157-69.
145. Chakravarthy U, Houston RF, Archer DB. Treatment of age-related subfoveal neovascular membranes by teletherapy: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 1993;77(5):265-73.
146. Hosoi Y, Yamamoto M, Ono T, Sakamoto K. Prostacyclin production in cultured endothelial cells is highly sensitive to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1993;63(5):631-8.
147. Verheij M, Koomen GC, van Mourik JA, Dewit L. Radiation reduces cyclooxygenase activity in cultured human endothelial cells at low doses. *Prostaglandins* 1994;48(6):351-66.
148. Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, et al. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood* 1995;86(11):4184-93.
149. Rosander K, Zackrisson B. DNA damage in human endothelial cells after irradiation in anoxia. *Acta Oncol* 1995;34(1):111-6.
150. Mooteri SN, Podolski JL, Drab EA, et al. WR-1065 and radioprotection of vascular endothelial cells. II. Morphology. *Radiat Res* 1996;145(2):217-24.
151. Waters CM, Taylor JM, Molteni A, Ward WF. Dose-response effects of radiation on the permeability of endothelial cells in culture. *Radiat Res* 1996;146(3):321-8.
152. Chakravarthy U, MacKenzie G. External beam radiotherapy in exudative age-related macular degeneration: a pooled analysis of phase I data. *Br J Radiol* 2000;73(867):305-13.
153. Prettenhofer U, Haas A, Mayer R, et al. Long-term results after external radiotherapy in age-related macular degeneration. A prospective study. *Strahlenther Onkol* 2004;180(2):91-5.

154. Barak A, Hauser D, Yipp P, et al. A phase I trial of stereotactic external beam radiation for subfoveal choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Br J Radiol* 2005;78(933):827-31.
155. Flaxel CJ. Use of radiation in the treatment of age-related macular degeneration. *Ophthalmol Clin North Am* 2002;15(4):437-44, v.
156. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3(1):24-40.
157. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;28(10):721-6.
158. Thomson AW, Woo J. Immunosuppressive properties of FK-506 and rapamycin. *Lancet* 1989;2(8660):443-4.
159. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, et al. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995;270(2):815-22.
160. Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996;14:483-510.
161. Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci* 1996;58(5):373-95.
162. Poon M, Marx SO, Gallo R, et al. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996;98(10):2277-83.
163. Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 2004;10(6):594-601.
164. Salas-Prato M, Assalian A, Mehdi AZ, et al. Inhibition by rapamycin of PDGF- and bFGF-induced human tenon fibroblast proliferation in vitro. *J Glaucoma* 1996;5(1):54-9.
165. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8(2):128-35.
166. Luan FL, Ding R, Sharma VK, et al. Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis. *Kidney Int* 2003;63(3):917-26.
167. Campochiaro PA. Ocular versus extraocular neovascularization: mirror images or vague resemblances. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(2):462-74.

168. Toso C, Meeberg GA, Bigam DL, et al. De novo sirolimus-based immunosuppression after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: long-term outcomes and side effects. *Transplantation* 2007;83(9):1162-8.
169. Dejneka NS, Kuroki AM, Fosnot J, et al. Systemic rapamycin inhibits retinal and choroidal neovascularization in mice. *Mol Vis* 2004;10:964-72.
170. Nussenblatt RB, Byrnes G, Sen HN, et al. A randomized pilot study of systemic immunosuppression in the treatment of age-related macular degeneration with choroidal neovascularization. *Retina*;30(10):1579-87.
171. Mahanthappa N. Translating RNA interference into therapies for human disease. *Pharmacogenomics* 2005;6(8):879-83.
172. Shen J, Samul R, Silva RL, et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006;13(3):225-34.
173. Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 2003;9:210-6.
174. Vasilaki A, Thermos K. Somatostatin analogues as therapeutics in retinal disease. *Pharmacol Ther* 2009;122(3):324-33.
175. Grant MB, Caballero S, Millard WJ. Inhibition of IGF-I and b-FGF stimulated growth of human retinal endothelial cells by the somatostatin analogue, octreotide: a potential treatment for ocular neovascularization. *Regul Pept* 1993;48(1-2):267-78.
176. Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, et al. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* 1997;276(5319):1706-9.
177. Spraul CW, Kaven CK, Kampmeier JK, et al. Effect of thalidomide, octreotide, and prednisolone on the migration and proliferation of RPE cells in vitro. *Curr Eye Res* 1999;19(6):483-90.
178. Higgins RD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularization. *Exp Eye Res* 2002;74(5):553-9.
179. Sall JW, Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE. Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2004;79(4):465-76.
180. Catalani E, Cervia D, Martini D, et al. Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *Eur J Neurosci* 2007;25(5):1447-59.

181. Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, et al. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(8):3480-9.
182. Mastrodimou N, Kiagiadaki F, Thermos K. The role of nitric oxide and cGMP in somatostatin's protection against retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(1):342-9.
183. Grant MB, Caballero S. Somatostatin analogues as drug therapies for retinopathies. *Drugs Today (Barc)* 2002;38(11):783-91.
184. Grant MB, Caballero S, Jr. The potential role of octreotide in the treatment of diabetic retinopathy. *Treat Endocrinol* 2005;4(4):199-203.
185. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, et al. The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care* 2000;23(4):504-9.
186. Hernandez C, Carrasco E, Casamitjana R, et al. Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects. *Diabetes Care* 2005;28(8):1941-7.
187. Lang GE. Pharmacological treatment of diabetic retinopathy. *Ophthalmologica* 2007;221(2):112-7.
188. Chantelau E, Kohner EM. Why some cases of retinopathy worsen when diabetic control improves. *Bmj* 1997;315(7116):1105-6.
189. Spranger J, Mohlig M, Osterhoff M, et al. Retinal photocoagulation does not influence intraocular levels of IGF-I, IGF-II and IGF-BP3 in proliferative diabetic retinopathy-evidence for combined treatment of PDR with somatostatin analogues and retinal photocoagulation? *Horm Metab Res* 2001;33(5):312-6.
190. Hellstrom A, Carlsson B, Niklasson A, et al. IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(7):3413-6.
191. Bauer W, Briner U, Doepfner W, et al. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 1982;31(11):1133-40.
192. Battershill PE, Clissold SP. Octreotide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in conditions associated with excessive peptide secretion. *Drugs* 1989;38(5):658-702.
193. Pless J, Bauer W, Briner U, et al. Chemistry and pharmacology of SMS 201-995, a long-acting octapeptide analogue of somatostatin. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986;119:54-64.

194. Lamberts SW, Uitterlinden P, del Pozo E. SMS 201-995 induces a continuous decline in circulating growth hormone and somatomedin-C levels during therapy of acromegalic patients for over two years. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65(4):703-10.
195. Lamberts SW, Uitterlinden P, Verschoor L, et al. Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995. *N Engl J Med* 1985;313(25):1576-80.
196. Newman CB, Melmed S, Snyder PJ, et al. Safety and efficacy of long-term octreotide therapy of acromegaly: results of a multicenter trial in 103 patients--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(9):2768-75.
197. Bicas HEA JA. *Oftalmologia: Fundamentos e Aplicações*, 1 ed. São Paulo: Tecmedd Editora, 2007; 668.
198. Wolff E. *Anatomy of the eye and orbit*, 8 ed. London: Chapman & Hall, 1997.
199. Kanski JJ. *Oftalmologia Clínica - Uma abordagem sistemática Tradução da Quinta Edição* ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
200. Dantas AM. Olho. In: *Anatomia Funcional do Olho e seus Anexos*: Revinter, 2002.
201. David J Spalton RAH, Paul A Hunter. *Atlas de Oftalmologia Clínica*, Terceira ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
202. Davis FA. The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1929;27:400 2-41.
203. Agrawal RN, He S, Spee C, et al. In vivo models of proliferative vitreoretinopathy. *Nat Protoc* 2007;2(1):67-77.
204. Clarke TF, Johnson TE, Burton MB, et al. Corneal injury threshold in rabbits for the 1540 nm infrared laser. *Aviat Space Environ Med* 2002;73(8):787-90.
205. Wilson SE, Hong JW. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea* 2000;19(4):417-20.
206. Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, et al. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals--part I: animal models and toxicity assays. *Ophthalmic Res*;44(2):82-104.
207. Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, et al. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals--part II: retinal toxicity of current and new drugs. *Ophthalmic Res*;44(4):205-24.

208. Clark AF, Yorio T. Ophthalmic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(6):448-59.
209. Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60(2):207-25.
210. Romano C, Hicks D. Adult retinal neuronal cell culture. *Prog Retin Eye Res* 2007;26(4):379-97.
211. Rosolen SG, Rigaudiere F, Le Gargasson JF, Brigell MG. Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Doc Ophthalmol* 2005;110(1):57-66.
212. Kozak I, Cheng L, Silva GA, Freeman WR. Testing of intraocular drugs for clinical use. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(11):4861-3.
213. Rosolen SG, Kolomiets B, Varela O, Picaud S. Retinal electrophysiology for toxicology studies: applications and limits of ERG in animals and ex vivo recordings. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60(1):17-32.
214. Short BG. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicol Pathol* 2008;36(1):49-62.
215. Maurice D. Review: practical issues in intravitreal drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001;17(4):393-401.
216. Chen SN, Yang TC, Ho CL, et al. Retinal toxicity of intravitreal tissue plasminogen activator: case report and literature review. *Ophthalmology* 2003;110(4):704-8.
217. Penha FM, Maia M, Eid Farah M, et al. Effects of subretinal injections of indocyanine green, trypan blue, and glucose in rabbit eyes. *Ophthalmology* 2007;114(5):899-908.
218. Rodrigues EB, Meyer CH, Mennel S, Farah ME. Mechanisms of intravitreal toxicity of indocyanine green dye: implications for chromovitrectomy. *Retina* 2007;27(7):958-70.
219. Komarowska I, Heilweil G, Rosenfeld PJ, et al. Retinal toxicity of commercially available intravitreal ketorolac in albino rabbits. *Retina* 2009;29(1):98-105.
220. Smith RS, Hawes NL, Chang B, Nishinaa PM. Retina. In: Smith RS, ed. *Systematic evaluation of the mouse eye - Anatomy, Pathology and Biomethods.*: CRC Press, 2000; v. 1.
221. ARVO. Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2006.
222. Fonseca NM, Goldenberg S, Gomes PdO, Lima CAdP. Anestesia em Coelhos. *Acta Cir. Bras.* 1996;11(2):82-104.

223. Aiello LP, Brucker AJ, Chang S, et al. Evolving guidelines for intravitreal injections. *Retina* 2004;24(5 Suppl):S3-19.
224. Meyers SM, Rodrigues MM. Effect of selected intravitreal drugs after severe penetrating injury in rabbits. *Curr Eye Res* 1981;1(8):471-7.
225. Fishman PH, Peyman GA, Lesar T. Intravitreal liposome-encapsulated gentamicin in a rabbit model. Prolonged therapeutic levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27(7):1103-6.
226. Zeng YC, Jin ZJ, Gu PK. Retinal toxicity in albino rabbits induced by intravitreal injection of strophanthin-K. *J Ocul Pharmacol* 1990;6(1):51-60.
227. Zeng S, Hu C, Wei H, et al. Intravitreal pharmacokinetics of liposome-encapsulated amikacin in a rabbit model. *Ophthalmology* 1993;100(11):1640-4.
228. Hegazy HM, Kivilcim M, Peyman GA, et al. Evaluation of toxicity of intravitreal ceftazidime, vancomycin, and ganciclovir in a silicone oil-filled eye. *Retina* 1999;19(6):553-7.
229. Alikacem N, Yoshizawa T, Nelson KD, Wilson CA. Quantitative MR imaging study of intravitreal sustained release of VEGF in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1561-9.
230. Liang C, Peyman GA, Conway MD, Woltering EA. Retinal toxicity of intravitreal octreotide in the rabbit. *Can J Ophthalmol* 1997;32(4):229-32.
231. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol* 1995;113(12):1479-96.
232. Angulo Bocco MC, Glacet-Bernard A, Zourdani A, et al. [Intravitreal injection: retrospective study on 2028 injections and their side effects]. *J Fr Ophtalmol* 2008;31(7):693-8.
233. Fintak DR, Shah GK, Blinder KJ, et al. Incidence of endophthalmitis related to intravitreal injection of bevacizumab and ranibizumab. *Retina* 2008;28(10):1395-9.
234. Forster RK. The endophthalmitis vitrectomy study. *Arch Ophthalmol* 1995;113(12):1555-7.
235. Fung AE, Rosenfeld PJ, Reichel E. The International Intravitreal Bevacizumab Safety Survey: using the internet to assess drug safety worldwide. *Br J Ophthalmol* 2006;90(11):1344-9.
236. Ahn DS, Flores-Aguilar M, Kirsch L, et al. Evaluation of retinal toxicity of acetylcholine in rabbit eyes. *Retina* 1995;15(4):327-31.

237. Maia M, Kellner L, de Juan E, Jr., et al. Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into the subretinal space in rabbits. *Retina* 2004;24(1):80-91.
238. Maia M, Margalit E, Lakhanpal R, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina* 2004;24(1):69-79.
239. Bakri SJ, Pulido JS, Mukherjee P, et al. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal nanogold in a rabbit model. *Retina* 2008;28(1):147-9.
240. Kaempf S, Johnen S, Salz AK, et al. Effects of bevacizumab (Avastin) on retinal cells in organotypic culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(7):3164-71.
241. Luthra S, Narayanan R, Marques LE, et al. Evaluation of in vitro effects of bevacizumab (Avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina* 2006;26(5):512-8.
242. Cheng CK, Peng PH, Tien LT, et al. Bevacizumab is not toxic to retinal ganglion cells after repeated intravitreal injection. *Retina* 2009;29(3):306-12.
243. Feiner L, Barr EE, Shui YB, et al. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in rabbit eyes. *Retina* 2006;26(8):882-8.
244. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006;26(3):257-61.
245. Sancho-Tello M, Johnsen-Soriano S, Muriach M, et al. Transient bevacizumab (avastin)-induced alterations in rat eyes. *Ophthalmic Res* 2009;41(1):28-35.
246. Robertson JE, Westra I, Woltering EA, et al. Intravitreal injection of octreotide acetate. *J Ocul Pharmacol Ther* 1997;13(2):171-7.
247. Ameri H, Chader GJ, Kim JG, et al. The effects of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular membrane and normal capillaries in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(12):5708-15.
248. Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA, et al. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. *Am J Ophthalmol* 2006;142(1):162-4.

8 OUTRAS FONTES CONSULTADAS

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo; 2001.86p.

Ferreira ABH. *Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa*. 3ª ed. Curitiba: Positivo, 2004. 2120 p.

Figueiredo AM, Souza SRG. *Como elaborar projetos, monografias, dissertações e teses: da redação científica à apresentação do texto final*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Lumen Juris, 2005. 276 p.

Houaiss A, Villar MS, Franco FMM. *Dicionário Houaiss de sinônimos e antônimos da língua portuguesa*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2003. 954 p.

Spector N. *Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 150 p.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer do comitê de ética



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 129//06 Goiânia, 14/12/2006

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dr. Alexandre Augusto Cabral de Mello Ventura

TÍTULO: “Análise da toxicidade retiniana da injeção intra-vítrea de Acetato de Ocreotida em olhos de coelhos não albinos”.

Área Temática: Grupo III

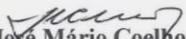
Local de Realização: Hospital das Clínicas/UFG - CEROF

Senhor(a) Pesquisador(a),

Após análise das modificações solicitadas, informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal **aprovou sem restrições** o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

→ 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 trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 261 3006 - FAX: 261 29 91
GOIÂNIA - GOIÁS

ANEXO 2 – Bula do Sandostatin® (Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça)

SANDOSTATIN®

octreotida

Formas farmacêuticas e apresentações

Solução para injeção (subcutânea) ou concentrado de solução para infusão (infusão intravenosa). Embalagem com 5 ampolas de 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL ou 0,5 mg/mL.

USO ADULTO

Composição

Cada ampola contém 0,05 mg, 0,1 mg ou 0,5 mg de octreotida (como peptídeo livre).

Excipientes: ácido láctico, manitol, bicarbonato de sódio, dióxido de carbono e água para injeção (sc e iv).

SANDOSTATIN solução para injeção contém menos de 1 mmol (23 mg) de sódio por dose, ou seja, essencialmente livre de sódio.

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

Ação esperada do medicamento: SANDOSTATIN apresenta como substância ativa a octreotida, derivado sintético da somatostatina, que atua como inibidor da liberação de hormônio do crescimento, glucagon e insulina.

Cuidados de armazenamento - Para armazenamento prolongado, as ampolas de SANDOSTATIN devem ser mantidas sob refrigeração (entre 2 a 8°C). Proteger da luz. Para uso diário, podem ser armazenados à temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C), por até 2 semanas.

Prazo de validade: O prazo de validade está impresso no cartucho. Não utilize o produto após a data de validade.

Gravidez e lactação: Informe ao seu médico sobre a ocorrência de gravidez na vigência do tratamento ou após o seu término. Mulheres com potencial para engravidar devem usar um método contraceptivo durante o tratamento. Não se sabe se SANDOSTATIN passa para o leite materno, todavia mulheres não devem amamentar durante o tratamento com SANDOSTATIN

Cuidados de administração: A aplicação do medicamento por injeção subcutânea pode ser feita pelo próprio paciente, o qual nesse caso, deverá receber instruções precisas do médico ou do enfermeiro. Siga a orientação do seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento.

Interrupção do tratamento: Não interromper o tratamento sem o conhecimento do seu médico. Caso haja esquecimento da dose por alguns dias, alguns sintomas temporários poderão reaparecer.

Reações adversas: Os principais efeitos colaterais observados com SANDOSTATIN são as reações no local da injeção e os efeitos gastrintestinais. Informe ao seu médico sobre o aparecimento de reações desagradáveis.

TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS.

Ingestão concomitante com outras substâncias: Informe ao seu médico sobre qualquer medicamento que esteja usando, antes do início ou durante o tratamento. SANDOSTATIN geralmente pode ser administrado enquanto você estiver utilizando outros medicamentos, porém, alguns deles, como por exemplo cimetidina, ciclosporina e bromocriptina, podem ser afetados por SANDOSTATIN. Se você é diabético, informe ao seu médico pois seu tratamento antidiabético pode sofrer ajuste de dose.

Contra-indicações e precauções: Os pacientes que apresentarem reações alérgicas à octreotida ou a qualquer componente da formulação não devem utilizar SANDOSTATIN. Os pacientes tratados com SANDOSTATIN devem ser cuidadosamente monitorados, pois eventualmente pode ocorrer expansão dos tumores hipofisários secretores de hormônio do crescimento. Nestes casos procedimentos alternativos devem ser tomados. Ajustes de dose podem ser necessários se você está utilizando outros medicamentos como os que controlam a pressão arterial (beta-bloqueadores ou bloqueadores de canais de cálcio) ou agentes que controlam o balanço hídrico e eletrolítico. Informe ao seu médico se você tem ou já teve cálculos biliares e se você tem histórico de deficiência de vitamina B12. Se você está sob tratamento prolongado com SANDOSTATIN, seu médico deve avaliar periodicamente a função da tireóide.

NÃO TOME REMÉDIO SEM O CONHECIMENTO DO SEU MÉDICO. PODE SER PERIGOSO PARA SUA SAÚDE.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

Farmacodinâmica

Grupo farmacoterapêutico: anti-hormônio do crescimento, código ATC H01CB02.

A octreotida é um octapeptídeo sintético, derivado da somatostatina natural, com efeitos farmacológicos similares, mas com duração de ação consideravelmente prolongada. Inibe a secreção patologicamente aumentada do hormônio de crescimento (GH), de peptídeos e da serotonina produzidos dentro do sistema endócrino gastroenteropancreático (GEP).

Em animais, a octreotida é um inibidor mais potente que a somatostatina da liberação de hormônio do crescimento, glucagon e insulina, com maior seletividade para a supressão de GH e glucagon.

Em indivíduos sadios SANDOSTATIN inibe:

- a liberação de hormônio do crescimento (GH) estimulada por arginina e hipoglicemia induzida por exercício e insulina.
- a liberação pós-prandial de insulina, glucagon, gastrina e outros peptídeos do sistema GEP e a liberação de insulina e glucagon estimulada pela arginina. *BPI 19.09.07 Modelo de Bula*
- a liberação do hormônio de estimulação da tireóide (TSH), estimulada pelo hormônio de liberação da tirotrófina (TRH).

Ao contrário da somatostatina, a octreotida inibe a secreção de GH preferencialmente à insulina e a administração de octreotida não é seguida por uma reação de hipersecreção de hormônios (isto é, GH em pacientes acromegálicos).

Em pacientes acromegálicos, SANDOSTATIN reduz os níveis plasmáticos do hormônio de crescimento (GH) e IGF-1. A redução em mais de 50% do valor do GH sérico ocorre em até 90% dos pacientes, e a redução do GH sérico para < 5 ng/mL pode ser atingida em cerca da metade dos casos. Este atinge índice de redução < 5

ng/mL na metade dos casos. Na maioria dos pacientes, SANDOSTATIN reduz acentuadamente os sintomas clínicos da doença, tais como cefaléia, edema da pele

e tecidos moles, hiper-hidrose, artralgia e parestesia. Em pacientes com grande adenoma hipofisário, o tratamento com SANDOSTATIN pode resultar em alguma diminuição da massa tumoral.

Em pacientes com tumores funcionais do sistema endócrino gastroenteropancreático, SANDOSTATIN, por seus diferentes efeitos

endócrinos, modifica diversas características clínicas. Ocorre melhora clínica e benefício sintomático em pacientes que ainda apresentam sintomas relacionados aos seus tumores, apesar das terapias anteriores, que podem incluir cirurgia, embolização da artéria hepática e vários quimioterápicos, por exemplo, estreptozotocina e 5- fluorouracil.

Os efeitos de SANDOSTATIN nos diferentes tipos de tumores são os seguintes: **Tumores carcinóides** - A administração de SANDOSTATIN pode causar melhora dos sintomas, particularmente rubor e diarreia. Em muitos casos isto se acompanha de queda na serotonina plasmática e excreção urinária reduzida do ácido 5- hidroxindol acético.

VIPomas - A característica bioquímica desses tumores é a superprodução de peptídeo intestinal vasoativo (VIP). Na maioria dos casos, a administração de SANDOSTATIN causa alívio da diarreia secretória grave típica da afecção, com conseqüente melhora na qualidade de vida. Isto se acompanha de uma melhora nas anormalidades eletrolíticas associadas, p. ex., hipocalcemia, permitindo que a suplementação enteral e parenteral de fluidos e eletrólitos seja retirada. Em alguns pacientes, o mapeamento por tomografia computadorizada sugere retardamento ou interrupção da progressão do tumor, ou mesmo sua diminuição, particularmente nas metástases hepáticas. A melhora clínica é em geral acompanhada por redução nos níveis plasmáticos de VIP, que podem reduzir-se a níveis dentro da faixa normal de referência.

Glucagonomas - A administração de SANDOSTATIN, na maioria dos casos, resulta em melhora substancial do exantema migratório necrótico, característico da afecção. O efeito de SANDOSTATIN sobre *diabetes mellitus* leve, que freqüentemente ocorre, não é acentuado e, em geral, não reduz as necessidades de insulina ou de agentes hipoglicemiantes orais. SANDOSTATIN melhora a diarreia e, portanto, o ganho de peso nos pacientes afetados. Embora a administração de SANDOSTATIN, com freqüência, cause redução imediata nos níveis plasmáticos de glucagon, esse decréscimo geralmente não se mantém durante períodos prolongados de administração, apesar da melhora sintomática mantida.

Gastrinomas/síndrome de Zollinger-Ellison - Embora inibidores da bomba de prótons ou a terapia com agentes bloqueadores do receptor-H2 controlem a ulceração péptica recorrente resultante da hipersecreção de ácido gástrico estimulada pela gastrina, tal controle pode ser incompleto. A diarreia pode também constituir sintoma proeminente não aliviado por esta terapia. SANDOSTATIN isolado ou em associação com inibidores da bomba de prótons ou com antagonistas do receptor-H2 pode reduzir a hipersecreção de ácido gástrico e melhorar os sintomas, inclusive a diarreia. Outros sintomas, possivelmente causados pela produção de peptídeo pelo tumor, p. ex., rubor, podem também ser aliviados. Os níveis plasmáticos de gastrina diminuem em alguns pacientes.

Insulinomas - A administração de SANDOSTATIN produz queda na insulina imunorreativa circulante, que pode, entretanto, ser de curta duração (cerca de 2 horas). Em pacientes com tumores operáveis, SANDOSTATIN pode ajudar a restaurar e manter a normoglicemia no pré-operatório. Em pacientes com tumores malignos ou benignos inoperáveis, o controle glicêmico pode ser melhorado, sem a redução concomitante dos níveis circulantes de insulina.

GHRHomas - Estes raros tumores são caracterizados pela produção do fator de liberação do hormônio de crescimento (GHRH) isolada ou juntamente com outros peptídeos ativos. SANDOSTATIN melhora as características e sintomas da acromegalia resultante. Isso provavelmente é causado pela inibição da secreção do GHRH e do hormônio de crescimento e pode ser seguido por uma redução no aumento hipofisário. Em pacientes com diarreia refratária relacionada à síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), SANDOSTATIN controla parcial ou completamente o débito de fezes em cerca de um terço dos pacientes com diarreia que não respondem aos agentes antidiarréicos e/ou anti-infecciosos convencionais.

Em pacientes submetidos à cirurgia pancreática, a administração peri e pósoperatória de SANDOSTATIN reduz a incidência das complicações típicas pósoperatórias (por exemplo, fístula pancreática, abscesso e sépsis subsequente e pancreatite aguda pós-operatória).

Em pacientes que apresentam varizes gastroesofágicas sangrantes decorrentes de cirrose subjacente, a administração de SANDOSTATIN, em combinação com tratamento específico (como por exemplo, escleroterapia), está associada com melhor controle do sangramento e ressangramento precoce, redução da necessidade de transfusão e melhor sobrevivência no 5º dia. Enquanto o modo preciso de ação de SANDOSTATIN não estiver totalmente elucidado, considera-se que SANDOSTATIN reduza o fluxo sanguíneo esplâncnico por meio da inibição dos hormônios vasoativos (como por exemplo, VIP e glucagon).

Farmacocinética

Absorção

Após injeção subcutânea, SANDOSTATIN é rápido e completamente absorvido. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas dentro de 30 minutos.

Distribuição

O volume de distribuição é de 0,27 L/kg e o *clearance* (depuração) orgânico total de 160 mL/min. A ligação protéica no plasma totaliza 65%. A quantidade de SANDOSTATIN ligada às células sanguíneas é insignificante.

Eliminação

A meia-vida de eliminação após administração subcutânea é de 100 min. Após injeção i.v. a eliminação é bifásica, com meias-vidas de 10 e 90 minutos, respectivamente. A maior parte do peptídeo é eliminado pelas fezes enquanto aproximadamente 32% é excretado inalterado na urina.

População de pacientes especiais

Alterações da função renal não afetam a exposição total (AUC) da octreotida administrada por injeção subcutânea. A capacidade de eliminação pode estar reduzida em pacientes com cirrose hepática, mas não em pacientes com degeneração gordurosa do fígado.

Dados de segurança pré-clínicos

Toxicidade Aguda

Estudos de toxicidade aguda com octreotida em camundongos revelaram valores de DL50 de 72 mg/kg por via intravenosa e de DL50 de 470 mg/kg por via subcutânea. Em ratos, o valor agudo da DL50 por via intravenosa foi determinado em 18 mg/kg. O acetato de octreotida foi bem tolerado em cachorros que receberam mais que 1 mg/kg do peso corpóreo por injeção *bolus* intravenosa.

Toxicidade com doses repetidas

Estudos com duração de 26 semanas realizados em cães que receberam doses acima de 0,5 mg/kg duas vezes ao dia, revelaram mudanças progressivas nas células hipofisárias acidófilas contendo prolactina. Maiores investigações mostraram que isto está dentro do âmbito fisiológico, aparentemente sem relação com a administração exógena de somatostatina. Não houve alterações significantes dos níveis plasmáticos de hormônios. Macacas *Rhesus* que receberam a mesma dose de 0,5 mg/kg duas vezes ao dia por três semanas não revelaram mudanças na hipófise e não houve alterações nos níveis plasmáticos basais do hormônio do crescimento, prolactina ou glicose.

Enquanto o veículo ácido produziu inflamação e fibroplasia em repetidas injeções subcutâneas em ratos, não houve evidências de que acetato de octreotida causasse reações de hipersensibilidade tipo tardia quando injetado intradermicamente em *guinea pigs* (porquinho da Índia) diluído a 0,1% em soluções salinas estéreis a 0,9%.

Mutagenicidade

A octreotida e/ou seus metabólitos foram isentos de potencial mutagênico quando investigados *in vitro* em sistemas celulares e bacterianos de testes validados. Foi observado um aumento na frequência das aberrações em cromossomos de células de *hamster* chinês V79 *in vitro* apenas em altas concentrações citotóxicas. Não houve aumento de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos incubados com acetato de octreotida *in vitro*. *In vivo* não foi observada atividade clastogênica na medula óssea de camundongos tratados com octreotida intravenosa (teste de micronúcleos) e não foram obtidas evidências de genotoxicidade em camundongos machos usando um ensaio de reparação de DNA da cabeça de espermatozóide. As microesferas foram isentas de potencial mutagênico quando testadas em ensaios validados *in vitro* com células bacterianas.

Carcinogenicidade/ toxicidade crônica:

Em ratos que receberam acetato de octreotida em doses diárias superiores a 1,25 mg/kg de peso corpóreo, foram observados fibrosarcomas, predominantemente em animais machos, no local da injeção subcutânea após 52, 104 e 113/116 semanas. Tumores locais também ocorreram em ratos controles, entretanto o desenvolvimento destes tumores foi atribuído a distúrbios de fibroplasia produzida pelos efeitos irritantes contínuos nos locais das injeções, agravado pelo veículo ácido láctico/manitol. Esta reação não-específica do tecido pareceu ser particular aos ratos. Não foram observadas lesões neoplásicas em camundongos que receberam diariamente injeções subcutâneas de octreotida em doses superiores de 2 mg/kg por 98 semanas, nem em cachorros tratados diariamente por 52 semanas com doses subcutâneas da droga.

O estudo de carcinogênese em ratos tratados por 116 semanas com injeções subcutâneas de octreotida também revelaram adenocarcinomas uterinos endometriais. Sua incidência só alcança significado estatístico em doses subcutâneas altas de 1,25 mg/kg por dia. Este achado foi associado ao aumento da incidência de endometrite, diminuição no número de corpos lúteos

ovarianos, redução de adenomas mamários e a presença de dilatação glandular e luminal do útero, sugerindo um estado de desbalanço hormonal. As informações disponíveis indicam claramente que a descoberta de tumores mediados pelo sistema endócrino em ratos são espécie específicos e não são relevantes para o uso de drogas em humanos.

Reprodução

Estudos sobre a fertilidade bem como estudos pré, peri e pós natal em ratos fêmeas não revelaram efeitos adversos na performance da reprodução ou no desenvolvimento da descendência quando doses subcutâneas acima de 1 mg/kg do peso corpóreo foram administradas por dia. O retardo do crescimento fisiológico observado nos cães filhotes foi transitório e atribuível a inibição de GH decorrente da excessiva atividade farmacodinâmica.

Indicações

Controle sintomático e redução dos níveis plasmáticos do hormônio de crescimento e da IGF-1 em pacientes com acromegalia, inadequadamente controlados por cirurgia ou radioterapia. O tratamento com SANDOSTATIN é também indicado para pacientes acromegálicos inaptos a, ou que não desejem, submeter-se à cirurgia, ou ainda no período de intervalo até que a radioterapia se torne completamente eficaz.

Alívio dos sintomas associados com tumores endócrinos gastroenteropancreáticos funcionais:

- Tumores carcinóides com características da síndrome carcinóide.
- VIPomas.
- Glucagonomas.
- Gastrinomas/síndrome de Zollinger-Ellison, geralmente em associação com terapia inibidores da bomba de prótons ou com antagonista-H2, com ou sem antiácidos.

- Insulinomas, para controle pré-operatório de hipoglicemia e terapia de manutenção.
- GHRHomas. SANDOSTATIN não constitui terapia antitumoral e não tem efeito curativo em tais pacientes.
- Controle de diarreia refratária associada com AIDS.
- Prevenção de complicações após cirurgia pancreática.
- Controle emergencial para cessar o sangramento e proteger contra o ressangramento causado por varizes gastroesofágicas em pacientes com cirrose. SANDOSTATIN deve ser usado em associação com tratamento específico, como a escleroterapia endoscópica.

Contra-indicações

Hipersensibilidade à octreotida ou a qualquer um dos excipientes.

Advertências e Precauções

Gerais

Tendo em vista que tumores hipofisários secretores de GH podem por vezes se expandir, causando complicações sérias (por ex., defeitos do campo visual), é essencial que todos os pacientes sejam cuidadosamente controlados. Se surgir evidência de expansão de tumor, procedimentos alternativos podem ser necessários.

Os benefícios terapêuticos da redução nos níveis do hormônio de crescimento (GH) e da normalização da concentração do Fator de Crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) em mulheres com acromegalia podem potencialmente restaurar a fertilidade. Pacientes com potencial para engravidar devem ser aconselhadas a utilizar um método contraceptivo adequado, se necessário, durante o tratamento com octreotida (vide “Gravidez e lactação”). A função da tireóide deve ser monitorizada em pacientes recebendo tratamento prolongado com octreotida.

Eventos cardiovasculares relatados

Tem sido relatado casos incomuns de bradicardia. Pode ser necessário ajustes de doses de drogas como beta-bloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio, ou agentes que controlam balanço hídrico e eletrolítico.

Vesícula biliar e eventos relacionados

A incidência da formação de cálculos biliares com o tratamento com SANDOSTATIN

é estimada em 15% a 30%. A incidência na população em geral é de 5% a 20%. Portanto, recomenda-se exame ultrassonográfico da vesícula biliar antes, e a intervalos de 6 a 12 meses, durante a terapia com SANDOSTATIN. Os cálculos biliares em pacientes tratados com SANDOSTATIN são geralmente assintomáticos. Cálculos sintomáticos devem ser tratados ou por terapia de dissolução com ácidos biliares ou por cirurgia.

Tumores endócrinos gastroenteropancreáticos

Durante o tratamento de tumores endócrinos gastroenteropancreáticos, podem ocorrer raros episódios de escapes repentinos do controle sintomático por SANDOSTATIN, com rápida recorrência de sintomas graves.

Metabolismo da glicose

Em função da ação inibitória sobre o hormônio do crescimento, o glucagon e a insulina, SANDOSTATIN pode afetar a regulação da glicose. A tolerância pósprandial à glicose pode ser prejudicada e, em alguns casos, a administração crônica pode induzir a um estado de hiperglicemia persistente.

Em pacientes com insulinomas, por sua potência relativa maior na inibição da secreção do hormônio de crescimento e glucagon, em comparação com a insulina, e pela duração mais curta de sua ação inibitória sobre a insulina, a octreotida pode aumentar a intensidade e prolongar a duração da hipoglicemia. Esses pacientes devem ser cuidadosamente monitorados durante o início da

terapia com SANDOSTATIN e a cada alteração na posologia. Flutuações acentuadas na concentração de glicose podem possivelmente ser reduzidas por doses menores e mais freqüentes.

As necessidades de insulina na terapia de pacientes com diabetes mellitus tipo I, podem ser reduzidas pela administração de SANDOSTATIN. Em pacientes não diabéticos e com diabetes tipo II, com reservas de insulina parcialmente intactas, a administração de SANDOSTATIN pode resultar em aumento prandial da glicemia. Portanto, recomenda-se a monitoração da tolerância à glicose e do tratamento antidiabético.

Varizes esofágicas

Há maior risco do desenvolvimento de diabetes insulino-dependente ou de alterações da necessidade de insulina em pacientes com diabetes preexistente após episódios de sangramento das varizes esofágicas. É obrigatória a monitoração apropriada dos níveis de glicemia.

Reações no local de aplicação

Em um estudo de toxicidade de 52 semanas em ratos, predominantemente em machos, foram observados sarcomas no local da injeção subcutânea apenas na dose mais alta (cerca de 40 vezes a dose máxima para os seres humanos). Não ocorreram lesões hiperplásicas ou neoplásicas no local da injeção subcutânea em um estudo de toxicidade de 52 semanas em cães. Não houve relato de formação de tumor nos locais de injeção em pacientes tratados com SANDOSTATIN por até quinze anos. Toda a informação disponível no momento indica que os achados em ratos são específicos da espécie e não apresentam relevância para o uso da droga em seres humanos.

Nutrição

A octreotida pode alterar a absorção de lipídeos da dieta em alguns pacientes. Foram observados em alguns pacientes recebendo terapia com octreotida, diminuição dos níveis de vitamina B12 e testes anormais de Schilling.

É recomendada a monitorização dos níveis de vitamina B12 durante terapia com SANDOSTATIN em pacientes com histórico de privação de vitamina B12.

A experiência com SANDOSTATIN em crianças é limitada.

Não existem evidências de redução da tolerabilidade ou da necessidade de alteração das doses em idosos tratados com SANDOSTATIN.

Efeitos sobre a habilidade de dirigir veículos e/ou operar máquinas:

Não existem dados sobre o efeito de SANDOSTATIN sobre a habilidade de dirigir e/ou operar máquinas.

Gravidez e lactação

Gravidez

Não há estudos adequados e bem controlados em mulheres grávidas. Na experiência pós-comercialização, dados de exposição de um número limitado de casos de gravidez foram reportados em pacientes com acromegalia, no entanto em metade dos casos, o acompanhamento foi desconhecido.

A maioria das mulheres foi exposta à octreotida em doses que variaram entre 100 a 300 mcg/dia de SANDOSTATIN s.c. ou 20 a 30 mg/mês de SANDOSTATIN LAR durante o primeiro trimestre de gestação. Em aproximadamente dois terços dos casos com acompanhamento conhecido, as mulheres escolheram continuar a terapia com octreotida durante a gravidez. Na maioria dos casos com acompanhamento conhecido, foram reportados neonatos normais, mas também muitos abortos espontâneos durante o primeiro trimestre e poucos abortos induzidos.

Não há casos de anomalias congênitas ou malformações atribuídos ao uso de octreotida nos casos reportados de acompanhamento de gravidez.

Estudos em animais não indicaram efeitos nocivos diretos ou indiretos em relação à gravidez, ao desenvolvimento embriofetal/fetal, ao parto ou ao

desenvolvimento pósnatal, exceto por algum retardo transitório no crescimento fisiológico (vide “Dados de segurança pré-clínicos”).

SANDOSTATIN deve ser prescrito para mulheres grávidas somente sob circunstâncias estritamente necessárias (vide “Advertências e Precauções”).

Lactação

Não se sabe se a octreotida é excretada no leite materno em humanos. Estudos em animais demonstraram excreção de octreotida em leite materno. Pacientes não devem amamentar durante o tratamento com SANDOSTATIN.

Interações medicamentosas

Observou-se que SANDOSTATIN reduz a absorção intestinal de ciclosporina e retarda a de cimetidina. A biodisponibilidade de bromocriptina é aumentada com a administração concomitante de octreotida.

Dados limitados indicam que análogos da somatostatina podem diminuir o *clearance* (depuração) metabólico dos componentes conhecidamente metabolizados pelas enzimas do citocromo P450, o que pode ser devido à supressão do hormônio do crescimento. Uma vez que não se pode excluir que a octreotida tenha este efeito, deve-se usar com precaução outras drogas metabolizadas principalmente pelo citocromo CYP3A4 e que tenham índices terapêuticos baixos (por exemplo: quinidina, terfenadina).

Reações adversas

As reações adversas mais frequentes reportadas durante a terapia com octreotida incluem distúrbios gastrointestinais, distúrbios do sistema nervoso, distúrbios hepatobiliares e distúrbios de metabolismo e nutricionais.

As reações adversas mais comumente relatadas em estudos clínicos com octreotida foram diarreia, dor abdominal, náusea, flatulência, dor de cabeça, colelitíase, hiperglicemia e constipação. Outras reações adversas comumente

reportadas foram tontura, dor localizada, barro biliar, disfunção da tireóide (por exemplo diminuição do hormônio estimulante da tireóide [TSH], diminuição de T4 total e diminuição de T4 livre), fezes amolecidas, tolerância prejudicada à glicose, vômitos, astenia e hipoglicemia.

Em raros casos, efeitos colaterais gastrointestinais podem assemelhar-se à obstrução intestinal aguda, com distensão abdominal progressiva, dor epigástrica intensa, sensibilidade abdominal e contratura involuntária. Dor ou sensação de picada, formigamento ou queimação no local da injeção subcutânea, com vermelhidão e edema, raramente durando mais do que quinze minutos. O desconforto local pode ser reduzido permitindo-se que a solução atinja a temperatura ambiente antes da aplicação da injeção ou injetando-se um volume menor, com o uso de solução mais concentrada.

As seguintes reações adversas, foram descritas em estudos clínicos com octreotida e estão listadas na Tabela 1 por ordem de frequência, da mais freqüente primeiro, usando a seguinte convenção: muito comum ($\geq 1/10$); comum ($\geq 1/100$, $< 1/10$); incomum ($\geq 1/1000$, $< 1/100$); raro ($\geq 1/10000$, $< 1/1000$); muito raro ($< 1/10000$); incluindo casos isolados. Dentro de cada grupo de frequência, as reações adversas estão listadas em ordem decrescente de gravidade.

Tabela 1. Reações adversas ao medicamento reportadas em estudos clínicos

Distúrbios gastrintestinais	
Muito Comuns	Diarréia, dor abdominal, náusea, constipação, flatulência.
Comuns	Dispepsia, vômito, distensão abdominal, esteatorréia, fezes amolecidas, descoloração das fezes.
Distúrbios do sistema nervoso	
Muito comum	Dor de cabeça
Comum	Tontura
Distúrbios endócrinos	
Comuns	Hipotireoidismo, disfunção da tireóide (por ex.: diminuição de TSH, T4 total e T4 livre)
Distúrbios hepatobiliares	
Muito comum	Colelitíase
Comuns	Colecistite, barro biliar, hiperbilirrubinemia.
Distúrbios de metabolismo e nutrição	
Muito Comum	Hiperqlicemia
Comuns	Hipoglicemia, tolerância prejudicada à glicose, anorexia.
Incomum	Desidratação
Distúrbios Gerais e no local de aplicação	
Muito comum	Dor no local da injeção.
Investigações	
Comum	Níveis elevados de transaminases
Distúrbios da pele e do tecido subcutâneo	
Comuns	Prurido, rash, alopecia.
Distúrbios respiratórios	
Comum	Dispneia.
Distúrbios cardíacos	
Comum	Bradycardia
Incomum	Taquicardia.

Embora a excreção fecal de gordura possa aumentar, não há evidências de que o tratamento a longo prazo com octreotida tenha conduzido à deficiência nutricional devido à malabsorção.

A ocorrência de efeitos colaterais gastrintestinais pode ser reduzida evitando-se ingerir alimentos perto dos horários de administração de SANDOSTATIN s.c., ou seja, injetando-o entre as refeições ou ao deitar. Em casos muito raros, relatou-se pancreatite aguda dentro das primeiras horas ou dias de tratamento com SANDOSTATIN s.c. e desaparece com a retirada do medicamento. Além disso, foi relatada pancreatite induzida por colelitíase em pacientes em tratamento prolongado com SANDOSTATIN s.c.

Em pacientes com acromegalia ou síndrome carcinóide, foram observadas, alterações no ECG tais como prolongamento do QT, desvio de eixo, repolarização precoce, baixa voltagem, transição R/S, progressão precoce da onda R e mudanças não-específicas da onda ST-T. Porém, a relação desses eventos com acetato de octreotida não é estabelecida, pois muitos destes pacientes possuíam histórico de doenças cardíacas (vide “Advertências e Precauções”).

Pós-comercialização

As reações adversas presentes na Tabela 2 foram reportadas voluntaria e espontaneamente e nem sempre é possível estabelecer com confiança a frequência ou a relação causal à exposição ao medicamento.

Tabela 2. Reações adversas ao medicamento espontaneamente reportadas

<i>Distúrbios do sistema imune</i>
<i>Anafilaxia, reações de hipersensibilidade/alergia</i>
<i>Distúrbios do tecido subcutâneo e pele</i>
<i>Urticária</i>
<i>Distúrbios hepatobiliares</i>
<i>Pancreatite aguda, hepatite aguda sem colestase, hepatite colestática, colestase, icterícia, icterícia colestática.</i>
<i>Distúrbios cardíacos</i>
<i>Arritmias</i>
<i>Investigações</i>
<i>Aumento dos níveis de fosfatase alcalina, aumento dos níveis de gama-glutamil transferase</i>

Posologia e administração

Incompatibilidades

O acetato de octreotida não é estável em Soluções para Nutrição Parenteral.

Acromegalia

Inicialmente 0,05 a 0,1 mg por injeção subcutânea a cada 8 ou 12 horas. O ajuste posológico deve ser baseado na avaliação mensal dos níveis de GH e

IGF-1 (meta: GH < 2,5 ng/mL e IGF-1 dentro dos limites normais) e dos sintomas clínicos, e na tolerabilidade. Na maioria dos pacientes, a dose diária ideal será de 0,3 mg. A dose máxima de 1,5 mg ao dia não deve ser excedida. Em

pacientes com doses estáveis de SANDOSTATIN, deve-se fazer avaliação de GH a cada 6 meses. Se não for obtida redução relevante dos níveis de GH e melhora dos sintomas clínicos dentro de 3 meses do início do tratamento com SANDOSTATIN, a terapia deve ser descontinuada.

Tumores endócrinos gastroenteropancreáticos

Inicialmente, 0,05 mg uma ou duas vezes ao dia por injeção subcutânea. Dependendo a resposta clínica, do efeito sobre os níveis dos hormônios produzidos pelo tumor (em casos de tumores carcinóides, da excreção urinária de ácido 5- hidroxindol acético) e da tolerabilidade, a posologia pode ser gradualmente aumentada para 0,1 a 0,2 mg, 3 vezes ao dia. Sob circunstâncias excepcionais, doses mais altas podem ser requeridas. As doses de manutenção devem ser ajustadas individualmente.

Em tumores carcinóides, a terapia deve ser descontinuada se não houver uma boa resposta dentro de 1 semana de tratamento com SANDOSTATIN com doses máximas toleradas.

Diarréia refratária relacionada à AIDS

Os dados sugerem que 0,1 mg três vezes ao dia por injeção subcutânea constitui a dose inicial ideal. Se a diarréia não for controlada após uma semana de tratamento, a dose deve ser titulada em base individual em até 0,25 mg três vezes ao dia. O ajuste osológico deve basear-se na avaliação do débito fecal e na tolerabilidade. Se não se alcançar melhora dentro de uma semana de tratamento com SANDOSTATIN na dose de 0,25 mg três vezes ao dia, a terapia deve ser descontinuada.

Complicações após cirurgia pancreática

A dose deve ser de 0,1 mg, três vezes ao dia, por injeção subcutânea, durante 7 dias consecutivos, a começar no dia da cirurgia/operação, pelo menos 1 hora antes da laparotomia.

Varizes gastroesofágicas sangrantes

A dose deve ser de 25 mcg/hora, durante cinco dias, por infusão intravenosa contínua. SANDOSTATIN pode ser usado em diluição com solução salina fisiológica.

Em pacientes cirróticos com varizes gastroesofágicas sangrantes, SANDOSTATIN tem sido bem tolerado em doses intravenosas contínuas de até 50 mcg/hora durante cinco dias.

Administração subcutânea

Os pacientes que irão auto-administrar a droga por injeção subcutânea devem receber orientações precisas do médico ou do enfermeiro.

Para reduzir o desconforto local, recomenda-se que a solução esteja à temperatura ambiente antes da aplicação. Devem ser evitadas aplicações múltiplas a intervalos curtos no mesmo local. As ampolas só devem ser abertas na hora da administração e qualquer sobra deve ser descartada.

Infusão intravenosa

Antes da administração verificar visualmente se o produto parenteral está límpido e livre de partículas.

SANDOSTATIN (octreotida) é física e quimicamente estável por 24 horas em soluções salinas fisiológicas estéreis e soluções de glicose a 5% em água. Todavia, uma vez que SANDOSTATIN pode afetar a homeostase da glicose, é

recomendável que sejam utilizadas no lugar de soluções de dextrose (glicose) as soluções fisiológicas salinas.

Soluções diluídas são física e quimicamente estáveis por no mínimo 24 horas abaixo

de 25°C. Do ponto de vista microbiológico é preferível utilizar a solução imediatamente. Se a solução não for utilizada imediatamente, ela deve ser armazenada entre 2 – 8°C. Entretanto, antes da administração a solução deve estar a temperatura ambiente.

O tempo acumulado entre a reconstituição, diluição, armazenamento na geladeira e o final da administração não deve ultrapassar 24 horas.

Em casos que SANDOSTATIN estiver sendo administrado por infusão intravenosa, o conteúdo de uma ampola de 0,5 mg deve ser dissolvido em 60 mL de solução fisiológica salina e deve ser infundido por meio de bomba de infusão. Isto deve ser repetido conforme a necessidade até que a duração prescrita do tratamento seja alcançada. SANDOSTATIN também tem sido infundido em concentrações mais baixas.

Em pacientes com cirrose hepática a meia-vida da droga pode estar aumentada, necessitando de ajuste da dose de manutenção. O prejuízo da função renal não afeta a exposição total da octreotida administrada por infusão subcutânea, conseqüentemente não é necessário o ajuste de dose.

Superdose

Um número limitado de superdoses acidentais de SANDOSTATIN em adultos e crianças foi reportado. Em adultos, as doses variaram entre 2400 – 6000 mcg/dia, administrados por infusão contínua (100 – 250 mcg/h) ou subcutaneamente (1500 mcg duas vezes ao dia). Os efeitos adversos reportados foram arritmia, hipotensão, parada cardíaca, hipóxia cerebral, pancreatite, esteatose hepática, diarreia, fraqueza, letargia, perda de peso, hepatomegalia e acidose láctica.

Em crianças, as doses variaram entre 50 – 3000 mcg/dia, administrados por infusão contínua (2,1 – 500 mcg/h) ou subcutaneamente (50 -100 mcg). O único evento adverso reportado foi hiperglicemia moderada.

Nenhum efeito adverso não esperado foi reportado em pacientes com câncer recebendo SANDOSTATIN em doses de 3000 – 30000 mcg/dia subcutaneamente, em doses múltiplas.

O controle da superdose é sintomático.

Recomendação para armazenamento

Para armazenamento prolongado, as ampolas de SANDOSTATIN devem ser mantidas à temperatura de 2 a 8°C. Proteger da luz. Não congelar. Para uso diário podem ser armazenadas à temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) por até 2 semanas.

Orientações da Novartis para o controle de pacientes durante tratamento com SANDOSTATIN com relação ao desenvolvimento de cálculos biliares.

1. Os pacientes devem submeter-se a exame ultrassonográfico da vesícula biliar no período basal antes de iniciar SANDOSTATIN.
2. Deve-se realizar exame ultrassonográfico periódico repetido da vesícula biliar, preferencialmente a intervalos de 6 a 12 meses, durante todo o tratamento com SANDOSTATIN.
3. Se os cálculos já estiverem presentes antes do início da terapia, o benefício potencial de SANDOSTATIN deve ser pesado contra os riscos potenciais associados aos cálculos biliares. Não há qualquer evidência, no momento, de que SANDOSTATIN afete adversamente o curso ou o prognóstico de cálculos biliares preexistentes.

Controle de pacientes que desenvolvem cálculos biliares em associação com SANDOSTATIN:

1. Cálculos biliares assintomáticos

SANDOSTATIN pode ser interrompido ou continuado, dependendo da reavaliação da relação risco/benefício. De qualquer modo, nenhuma ação é necessária, exceto continuar o controle, com frequência aumentada, se isso for considerado necessário.

2. Cálculos biliares sintomáticos

SANDOSTATIN pode ser interrompido ou continuado, dependendo da reavaliação da relação risco/benefício. De qualquer forma, os cálculos biliares devem ser tratados como quaisquer outros cálculos biliares sintomáticos. Do ponto de vista clínico, isso inclui terapia combinada com ácidos biliares (por ex., ácido quenodeoxicólico 7,5 mg/kg por dia, juntamente com ácido ursodeoxicólico 7,5 mg/kg por dia), associada com controle ultrassonográfico até que os cálculos tenham desaparecido completamente.

Precauções especiais para o descarte

Qualquer produto inutilizado ou resíduo deve ser descartado adequadamente.

VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA

Reg. MS - 1.0068.0009

Farm. Resp.: Marco A. J. Siqueira - CRF-SP 23.873

Lote, data de fabricação e de validade: vide cartucho

Fabricado por Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça

Embalado por Novartis Biociências S.A.

Av. Ibirama, 518 - Complexos 441/3 - Taboão da Serra - SP

CNPJ 56.994.502/0098-62

Indústria Brasileira

® = Marca registrada de Novartis AG, Basileia, Suíça



2007-PSB/GLC-0091-s

ANEXO 3 – Documento de isenção de conflitos de interesse

Declaração de Isenção de Conflitos de Interesse

Eu, Alexandre Augusto Cabral de Mello Ventura, autor da tese de doutorado intitulada: “**ANÁLISE DA TOXICIDADE RETINIANA DA INJEÇÃO INTRA-VÍTREA DE OCTREOTIDA (SANDOSTATIN®) EM OLHOS DE COELHOS NÃO ALBINOS**”, declaro que dentro dos últimos 5 anos e para o futuro próximo não possuo conflito de interesse de ordem pessoal, comercial, política e financeira na medicação Octreotida (Sandostatin®) utilizada no desenvolvimento desta tese.

Declaro também que todo o material utilizado durante o desenvolvimento da pesquisa e elaboração da tese de doutorado teve seus custos pagos pelo próprio autor do estudo.

Brasília, 12 de maio de 2011

Alexandre Augusto Cabral de Mello Ventura
(Autor)