



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DA PENETRAÇÃO OCULAR DA ERITROPOIETINA ADMINISTRADA
PELA VIA SUBCONJUNTIVAL EM COELHOS

ANA PAULA SIMÕES NUNES DE RESENDE RIBEIRO DE FARIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professora Doutora Anabela da Silva Moreira
Professora Doutora Esmeralda Delgado
Professora Doutora Berta São Bráz
Professora Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

ORIENTADOR

Professora Doutora
Esmeralda Delgado

CO-ORIENTADOR

Professora Doutora
Berta São Bráz

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DA PENETRAÇÃO OCULAR DA ERITROPOIETINA ADMINISTRADA
PELA VIA SUBCONJUNTIVAL EM COELHOS

ANA PAULA SIMÕES NUNES DE RESENDE RIBEIRO DE FARIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professora Doutora Anabela da Silva Moreira
Professora Doutora Esmeralda Delgado
Professora Doutora Berta São Bráz
Professora Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

ORIENTADOR

Professora Doutora
Esmeralda Delgado

CO-ORIENTADOR

Professora Doutora
Berta São Bráz

2009

LISBOA

DEDICATÓRIA

À minha mãe,

pelo exemplo de coragem que é!

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente:

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por todo o apoio, por terem estado sempre comigo...nos bons e maus momentos. São para mim verdadeiros exemplos de Vida!

À Professora Doutora Esmeralda Delgado, pela imensidão de conhecimentos transmitidos, pela franqueza, serenidade e profissionalismo inigualável. Obrigada por ser mais do que minha orientadora neste trabalho, ser uma verdadeira amiga.

À Professora Doutora Berta São Braz, a professora de sempre... que me acompanhou desde os primeiros passos na faculdade! Obrigada pelos conhecimentos partilhados, pela confiança depositada e pela força que me impeliu em todos os meus projectos.

Ao Zé, pelo companheirismo, amizade e dedicação que tornam possíveis todas as minhas aventuras nos meandros desta vida académica.

À Maria João, pela amizade única e insubstituível.

Por último, mas não menos importante, aos meus filhos Sofia e Manuel... porque a sua existência ilumina os meus dias, porque me despertam um sorriso a todo o instante, porque são o mais perfeito e belo que já fiz... são a essência da minha vida!

RESUMO

Estudos recentes demonstram que a Eritropoietina (EPO), para além do seu conhecido efeito eritropoiético, tem acção neuroprotectora e neuroregenerativa sobre as células ganglionares da retina (RGC), sendo actualmente considerada um promissor agente terapêutico nas doenças isquémicas retinianas como o glaucoma.

Estudos prévios utilizaram a via de administração sistémica, a via intravítrea ou a via retrobulbar para atingirem concentrações terapêuticas ao nível da retina, pouco exequíveis na prática clínica. Pretende-se estudar outra via de administração de EPO a nível ocular que demonstre eficácia, seja minimamente invasiva e que apresente uma baixa taxa de complicações.

Este trabalho tem por objectivo avaliar a via subconjuntival como via eficaz para a administração ocular de EPO.

Foram utilizados 6 coelhos albinos Nova Zelândia. A cada animal foi administrado num dos olhos 100 UI de EPO pela via subconjuntival. Os olhos contra laterais serviram como controlo. Foi doseada EPO no humor vítreo às 6, 12, 36 e 48 horas e no soro às 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 e às 48 horas após administração. A cada animal incluído no estudo foi realizada um hemograma no dia 0, no dia 7 e no dia 14 do ensaio, para avaliar os efeitos sistémicos da administração subconjuntival de EPO na eritropoiese, e foi realizado um electroretinograma (ERG) no dia 0 e no dia 30 do ensaio experimental.

A administração da EPO pela via subconjuntival permitiu a obtenção de uma curva de concentração vítrea, que atingiu a concentração máxima 12 horas após injeção com um valor de $0,60 \pm 0,06$ mUI/ml. Observou-se também uma curva de absorção sistémica que atingiu a concentração máxima 3 horas após injeção com um valor de $33,4 \pm 0,66$ mUI/ml. Tanto na contagem de glóbulos vermelhos como no hematócrito não se verificaram alterações significativas, nem aos 7 dias nem aos 14 dias após injeção. No que se refere ao ERG e analisando os resultados referentes à onda-a e ao intervalo N1-P1 verificou-se que não ocorreram alterações significativas desde o início do ensaio (dia 0) até ao final (dia 30). Quanto aos resultados observados na onda-b, observou-se um aumento de 49% ($p=0,031$) na resposta dos olhos tratados com EPO ao fim de 30 dias quando comparada com a resposta basal (dia 0).

Concluiu-se com este estudo que a administração subconjuntival é uma via alternativa para a utilização terapêutica da EPO no tratamento de doenças isquémicas retinianas. Mais estudos são necessários para definir a cinética vítrea e plasmática da EPO administrada pela via subconjuntival, tanto em condições fisiológicas como em condições de doença isquémica ocular.

Palavras-chave: Eritropoietina, via subconjuntival, retinopatias isquémicas.

ABSTRACT

Recently Erythropoietin (EPO) had been shown to have neuroprotective and neuroregenerative effects on retinal ganglion cells (RGC), apart from its erythropoietic properties. For this reason EPO is actually considered a promissory therapeutic agent on ischemic retinal diseases. The death of RGCs, which results in the progressive loss of visual function, occurs in glaucoma and other ocular diseases caused by hypoxia and ischemia.

All the previous studies used the systemic, intravitreal or retrobulbar administration to acquire therapeutic concentrations on the retina, both difficult to use in clinical practice. The goal is to study another route of administration of EPO to the eye that shows efficiency and is minimally invasive while presenting a low tax of complications in clinical practice.

With the present study we pretend to evaluate the efficacy of the subconjunctival delivery method of ocular EPO.

New Zealand white rabbits were used (n=6). EPO (100 UI) was administered by subconjunctival route to the right eye of each animal. The opposite eye served as control. After administration, EPO was measured in the vitreous humor at 6, 12, 36 and 48 hours, and in plasma at 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 and 48 hours. A blood count was performed to each animal included in the study on day 0, day 7 and day 14 of the experiments, to assess the effects on erythropoiesis of subconjunctival administration of EPO and an electroretinogram (ERG) was performed on day 0 and on day 30 of the procedures to evaluate the effects of subconjunctival administration of EPO on the retina.

The subconjunctival administration of EPO allowed a vitreous absorption curve which reached a maximum concentration 12 hours after injection with a value of 0.6 ± 0.06 mIU / ml and a plasmatic absorption curve which reached a maximum concentration after 3 hours injection with a value of 33.4 ± 0.66 mIU / ml. Both the red blood cell count and hematocrit evaluated on day 7 and day 14 after the injection showed no significant changes. Regarding the ERG and on what concerns the results of the a-wave and N1-P1 amplitudes, no significant changes were observed between the beginning of the experiments (day 0) and the end (30 days). Concerning to the b-wave amplitudes there was a remarkable increase of 49% ($p=0,031$) on the EPO treated eyes on day 30 when compared with the baseline response (day 0).

In conclusion, subconjunctival administration of EPO is a possible alternative to the therapeutic use on ischemic retinal diseases. Further studies are necessary to assess the blood and intravitreal kinetic of EPO after subconjunctival administration, both in physiological conditions and ischemic ocular disease.

Key words: Erythropoietin, subconjunctival administration, ischemic retinopathy.

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO DA DISSERTAÇÃO

- Resende A. P., Delgado E., São-Bráz B. e Souza-Ramalho P. (2009). Intravitreal and plasmatic levels of erythropoietin after subconjunctival administration on rabbits. Comunicação livre oral no Congresso Internacional da EVER (European Society for Vision and Eye Research) 1 a 4 de Outubro de 2009, Port Roz, Eslovénia.
- Resende A. P., Delgado E., São-Bráz B. e Souza-Ramalho P. (2009). Intravitreal and plasmatic levels of erythropoietin after subconjunctival administration on rabbits. Acta Ophthalmologica (aceite para publicação).
- Delgado E., Resende A. P., São-Bráz B. e Souza-Ramalho P. (2009). The effects of subconjunctival EPO administration on ERG and on peripheral blood haematocrit in animal model (rabbit). Comunicação livre oral no Congresso Internacional da EVER (European Society for Vision and Eye Research) 1 a 4 de Outubro de 2009, Port Roz, Eslovénia.
- Delgado E., Resende A. P., São-Bráz B. e Souza-Ramalho P. (2009). The effects of subconjunctival EPO administration on ERG and on peripheral blood haematocrit in animal model (rabbit). Acta Ophthalmologica (aceite para publicação).
- Souza-Ramalho P., Resende A. P., São-Bráz B. e Delgado E. (2009). Estudo da via subconjuntival como alternativa para administração de EPO ocular num modelo de olho animal – coelho. Comunicação livre oral no Congresso Internacional da SPO (Sociedade Portuguesa de Oftalmologia) 5 a 7 de Dezembro de 2009, Vilamoura, Portugal.
- Resende A. P., Delgado E, São-Bráz B. & Souza-Ramalho P. (2008). Doseamento de EPO no humor vítreo e plasma de coelho pelo método ELISA após administração por via subconjuntival e intravítrea – resultados preliminares. Livro de resumos do IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias / I Congresso Ibérico de Epidemiologia, pag.221. 27 a 29 Novembro de 2008, Santarém, Portugal. Apresentação de comunicação livre em painel (Anexo I).

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	1
1.1. Anatomia do Globo Ocular	1
a) Túnicas oculares	2
b) Conteúdo do globo ocular	5
c) Órgãos acessórios do olho	5
d) Vasculização da retina	6
e) Barreiras hemato-oculares	8
1.2. Morte celular programada – Apoptose	8
1.3. Glaucoma	10
1.4. Eritropoietina	15
1.5. Vias de administração de fármacos para o olho	17
2. Objectivos	23
3. Materiais e Métodos	25
3.1. População em estudo	25
3.2. Procedimentos experimentais	25
a) Injecções subconjuntivais	27
b) Colheitas de humor vítreo para doseamento de EPO	27
c) Colheitas de soro para doseamento de EPO	30
d) Colheitas de sangue para realização de hemogramas	31
e) Realização de Electoretinogramas (ERGs)	32
3.3. Análise estatística dos resultados	35
4. Resultados	37
4.1. Absorção vítrea	37
4.2. Absorção sistémica	38
4.3. Hemograma	39
4.4. ERG	40
5. Discussão	45
5.1. Absorção vítrea	45
5.2. Absorção sistémica e efeitos no hemograma	46
5.3. Efeitos no ERG	47
6. Conclusão	49
Bibliografia	51
Anexos	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura nº 1 – Anatomia do globo ocular (Adaptado de Getty, 1986)	1
Figura nº 2 – Representação esquemática das camadas da córnea (Adaptado de Gilger, 2005)	2
Figura nº 3 – Retina (Adaptado de Burkitt, 1994)	4
Figura nº 4 – Áreas da conjuntiva (Adaptado de Slatter, 2001)	5
Figura nº 5 – Diagrama esquemático da nutrição da retina (Adaptado de Duong, 2008)	6
Figura nº 6 – Imagens de fundo de olho observáveis por oftalmoscopia indirecta (Adaptado de Barnett, 2006)	7
Figura nº 7 – Efeito do aumento da pressão intra-ocular sobre a retina e o nervo óptico (Adaptado de North Cincinnati Eye Care, 2008)	11
Figura nº 8 – Imagens de fundo de olho de um cão saudável e de um cão com glaucoma (Adaptado de Barnett, 2006)	12
Figura nº 9 – Animais com glaucoma	13
Figura nº 10 – Vias de administração de fármacos para o segmento posterior do olho (Adaptado de Geroski, 1999)	18
Figura nº 11 – Animais utilizados no ensaio, coelhos albinos Nova Zelândia	25
Figura nº 12 – Administração subconjuntival de EPO	27
Figura nº 13 – Procedimentos preparatórios para a realização de uma punção vítrea.	28
Figura nº 14 – Colheita de sangue através do cateter localizado na veia marginal da orelha.	30
Figura nº 15 – Equipamento utilizado para a realização do ERG.	33
Figura nº 16 – Colocação dos eléctrodos para a realização do ERG no coelho anestesiado.	34
Figura nº 17 – Registo do ERG.	35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico nº 1 – Diagrama dos tempos de colheita de amostras de humor vítreo	28
Gráfico nº 2 – Diagrama dos tempos de colheita de amostras de soro	30
Gráfico nº 3 – Diagrama dos tempos de colheita de sangue para a realização de hemogramas	31
Gráfico nº 4 – Diagrama dos tempos de realização de ERG	32
Gráfico nº 5 – Variação da concentração de EPO (em mUI/ml) no humor vítreo de coelho ao longo do tempo (em horas) após injeção subconjunctival.	37
Gráfico nº 6 – Variação da concentração de EPO (em mUI/ml) no soro de coelho ao longo do tempo (em horas) após injeção subconjunctival.	38
Gráfico nº 7 – Resultados da contagem de eritrócitos aos 0, 7 e 14 dias nos 6 coelhos do estudo.	39
Gráfico nº 8 – Resultados do hematócrito aos 0, 7 e 14 dias nos 6 coelhos do estudo.	40
Gráfico nº 9 – Resultados dos diferentes parâmetros em estudo do ERG, onda-a, onda-b e intervalo N1-P1, referentes ao olho teste no início (dia 0) e do fim do estudo (dia 0).	41
Gráfico nº 10 – Resultados dos diferentes parâmetros em estudo do ERG, onda-a, onda-b e intervalo N1-P1, referentes ao olho controlo no início (dia 0) e do fim do estudo (dia 0).	42
Gráfico nº 11 – Resultados do ERG referentes à onda-a no início (dia 0) e no final do estudo (dia 30), nos olhos controlo e nos olhos teste.	43
Gráfico nº 12 – Resultados do ERG referentes à onda-b no início (dia 0) e no final do estudo (dia 30), nos olhos controlo e nos olhos teste.	43
Gráfico nº 13 – Resultados do ERG referentes ao intervalo N1-P1 no início (dia 0) e no final do estudo (dia 30), nos olhos controlo e nos olhos teste.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN – ácido desoxirribonucleico
EDTA – etilenodiaminotetracético
EPO – Eritropoietina
EPOR – Receptores de Eritropoietina
ERG – Electroretinograma
EV – Endovenoso
GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H & E – Coloração hematoxilina-eosina
IGF-1 – insulin-like growth factor
IL-3 – Interleucina 3
OD – Olho direito
OE – Olho esquerdo
PIO – Pressão intra-ocular
RGC – Células ganglionares da retina
rhEPO – Eritropoietina recombinante humana
RPE – Epitélio pigmentado da retina
SC – subconjunctival
SCF – stem cell factor
UI – Unidade Internacional

1. INTRODUÇÃO

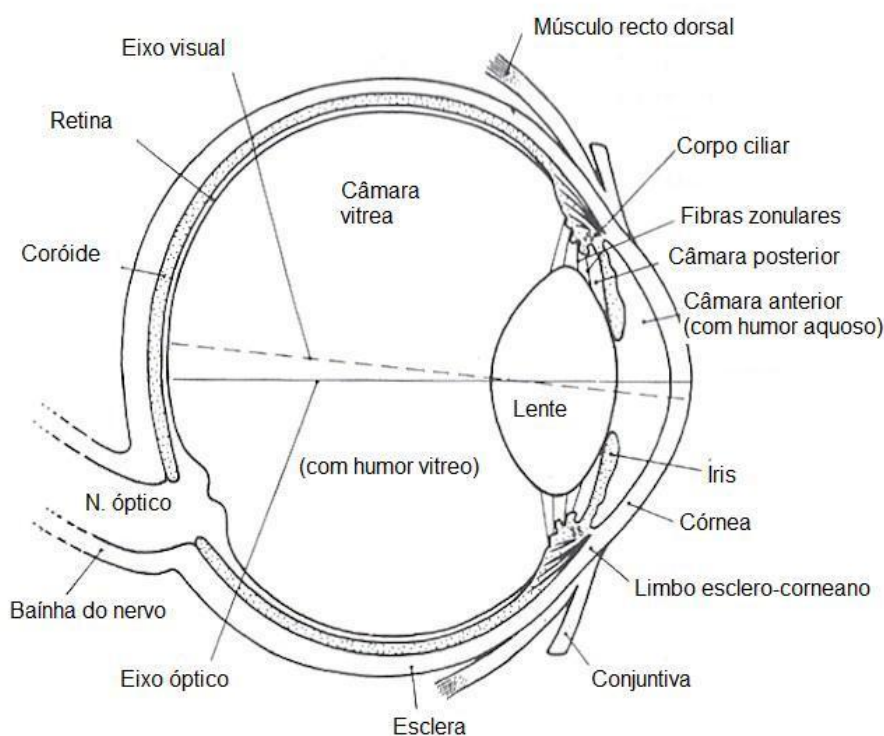
1.1. Anatomia do Globo Ocular

O olho é o órgão dos animais que permite detectar a luz e transformar essa percepção em impulsos eléctricos. Os olhos mais complexos servem para proporcionar o sentido da visão. O globo ocular está alojado dentro de uma cavidade óssea, a órbita, e está protegido pelas pálpebras. Possui no seu exterior os músculos extra-oculares que são responsáveis pelos movimentos oculares, e também três camadas concêntricas justapostas entre si com a função de visão, nutrição e protecção (Getty,1986).

O tamanho, forma e posição dos olhos nas orbitas, depende da altura do dia em que existe maior actividade visual e do comportamento alimentar. Nos carnívoros, como o cão e o gato, os eixos visuais localizam-se rostralmente, o que lhes proporciona uma excelente visão binocular, ideal para espécies predadoras. Já os cavalos e os ruminantes têm os olhos localizados lateralmente o que lhes confere uma visão maioritariamente monocular e com um amplo campo de visão, característico de espécies predadas (Gelatt, 2007).

A figura nº 1 representa um esquema da anatomia do globo ocular.

Figura nº 1 – Anatomia do globo ocular (Adaptado de Getty, 1986)



a) Túnicas oculares

O globo ocular é composto por três túnicas que se situam em íntima aposição. Juntas formam uma lâmina estratificada que rodeia o centro (líquido e gelatinoso).

A primeira, a túnica fibrosa externa dá forma e confere protecção ao globo ocular. É composta por duas partes: a esclera e a córnea.

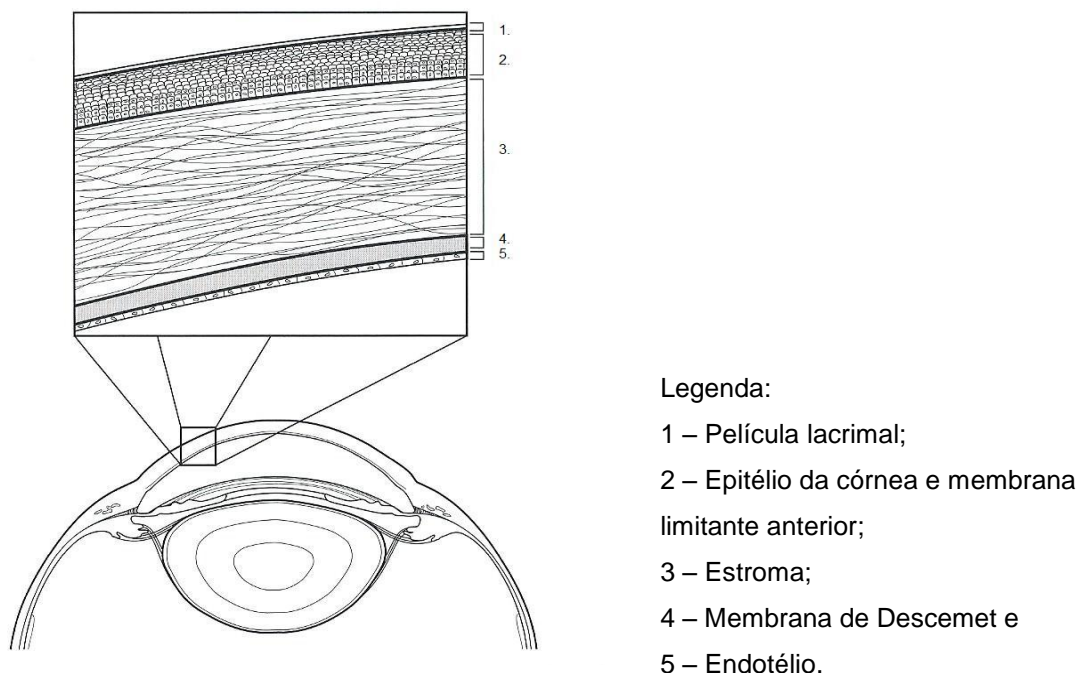
A esclera é constituída por fibras de colagénio e elásticas e é de cor branca e resistente. No seu pólo posterior localiza-se a área crívosa que permite a passagem das fibras do nervo óptico e dos vasos da retina (Petersen-Jones, 2002).

A córnea, que representa $\frac{1}{4}$ da túnica fibrosa, possui uma forma semelhante à de um vidro de relógio, é dura e resistente. Em situação fisiológica a córnea é avascular, sendo o transporte de nutrientes assegurado pela película lacrimal e pelo humor aquoso (Gelatt, 2007). A película lacrimal pré-corneana que reveste a superfície da córnea é produzida pelo sistema lacrimal e pálpebras e confere uma superfície óptica regular e lisa (Gilger, 2005).

A córnea é um meio transparente devido à sua estrutura e a constantes processos fisiológicos de bombagem de líquido ao nível do endotélio, facto que permite a refacção da luz. É constituída por 5 camadas: epitélio anterior; membrana limitante anterior; substância própria ou estroma que representa 90% da sua espessura, formado por tecido conjuntivo especial rico em colagénio; membrana limitante posterior ou Membrana de Descemet que é elástica e por fim endotélio (Gilger, 2005).

A figura nº 2 representa esquematicamente as camadas da córnea juntamente com a película lacrimal que a protege.

Figura nº 2 – Representação esquemática das camadas da córnea (Adaptado de Gilger, 2005)



A linha de separação entre a esclera e a córnea é designado limbo esclero-corneano.

A túnica fibrosa isola o interior do globo ocular não só de produtos químicos nocivos como substâncias usadas na terapêutica, actuando como um obstáculo importante para o acesso de medicação tópica para os tecidos alvo intra-oculares (Mannermaa, Vellonen & Urtili, 2006).

A segunda, a túnica vascular média consiste principalmente em vasos sanguíneos e músculo liso e que regula a nutrição do olho, a forma do cristalino e o tamanho da pupila.

É composta por três partes: coroide, corpo ciliar e íris. A coroide situa-se entre a esclera e a retina e é uma camada vascular e pigmentada que rodeia totalmente o hemisfério posterior do globo, exceptuando a zona da área crívosa (onde se localiza o disco óptico) e é responsável pela nutrição da retina. O corpo ciliar corresponde a um espessamento da túnica vascular situado entre a coroide e a íris, com cristas que irradiam até ao cristalino conhecidas como processos ciliares. Por fim a íris, o segmento mais anterior da túnica vascular que se projecta dentro do globo ocular, é um diafragma contráctil com uma abertura central (pupila) que controla a quantidade de luz que penetra no interior do globo ocular e estimula a retina. A íris divide o espaço entre o cristalino e a córnea, em câmara anterior e posterior, que comunicam através da pupila, estando ambas preenchidas com humor aquoso (Gelatt, 2007).

O tapete lúcido que se localiza na coroide, é uma estrutura avascular fibrosa (ungulados) ou celular (carnívoros) que tem como função reflectir a luz de volta aos fotorreceptores, maximizando assim a visão nocturna destes animais.

A terceira túnica, ou túnica nervosa, mais interna, é constituída fundamentalmente por tecido nervoso e é a camada mais directamente implicada na visão. É constituída unicamente pela retina que contém as células receptoras sensíveis à luz e é um prolongamento do cérebro ao qual permanece ligada pelo nervo óptico.

A retina tem a forma de uma hemisfera oca, forra a coroide internamente e termina ao nível do corpo ciliar e íris.

Histologicamente consideram-se 10 estratos (Gelatt, 2007), que no sentido postero-anterior são:

1. Epitélio Pigmentado Retina
2. Camada de fotorreceptores (cones e bastonetes)
3. Membrana Limitante Externa
4. Camada Nuclear Externa (corpos celulares dos cones e bastonetes)
5. Camada Plexiforme Externa
6. Camada Nuclear Interna (Células bipolares)

7. Camada Plexiforme Interna
8. Células Ganglionares
9. Fibras do Nervo Óptico
10. Membrana Limitante Interna

Em termos funcionais podemos considerar duas camadas: a camada pigmentada (1) e a camada nervosa (do 2-10) (Petersen-Jones, 2002).

A figura nº 3 representa um diagrama esquemático (figura nº 3 A) e um corte histológico (figura nº 3 B) das camadas que compõem a retina.

Figura nº 3 – Retina (Adaptado de Burkitt, 1994)

Figura nº 3 A – Diagrama da retina onde são representadas esquematicamente as suas 10 camadas

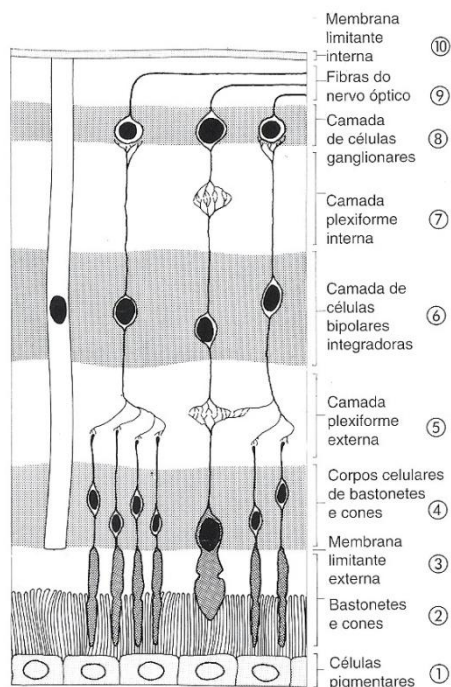
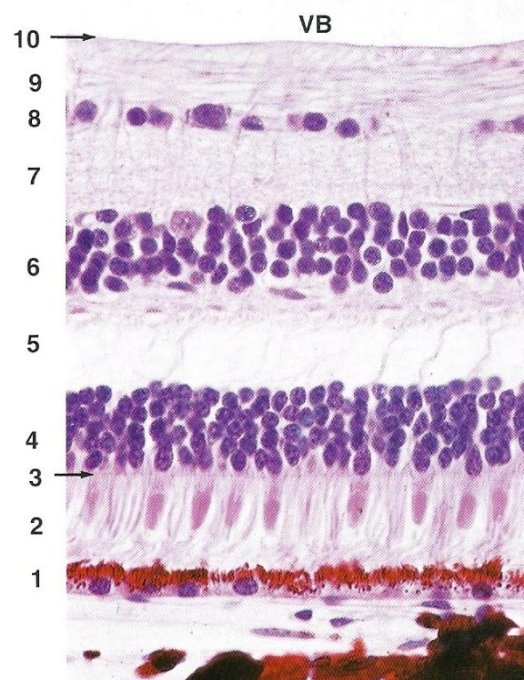


Figura nº 3 B – Corte histológico da retina corada com a coloração de H & E observada numa ampliação de 640 vezes



As fibras das células ganglionares da retina, desprovidas de mielina, convergem para a formação do nervo óptico que, por sua vez, transmite os impulsos gerados na retina para o sistema nervoso central. O disco óptico é a área ventrolateral do globo por onde passam, através da área crivosa da esclera, as fibras do nervo óptico e que possui uma depressão central (escavação do nervo óptico).

b) Conteúdo do globo ocular

a) Câmaras oculares anterior e posterior com humor aquoso

A câmara anterior está localizada entre a córnea e a íris e comunica-se com a câmara posterior, menor e localizada entre a íris e o cristalino, através da pupila. O humor aquoso é produzido no corpo ciliar do olho, fluindo da câmara posterior através da pupila para a câmara anterior. A rede trabecular do ângulo iridocorneal drena então o líquido para o sistema venoso. Todos os olhos possuem alguma pressão intra-ocular que é causada pela presença de alguma resistência ao fluxo do humor aquoso através da rede trabecular.

b) Cristalino ou lente

É uma estrutura sólida mas elástica, biconvexa e transparente. É formado por uma cápsula onde se fixam as fibras zonulares do corpo ciliar e por substância própria, que é constituída por fibras de colagénio organizadas de forma muito regular, concêntrica.

c) Câmara vítrea com corpo vítreo

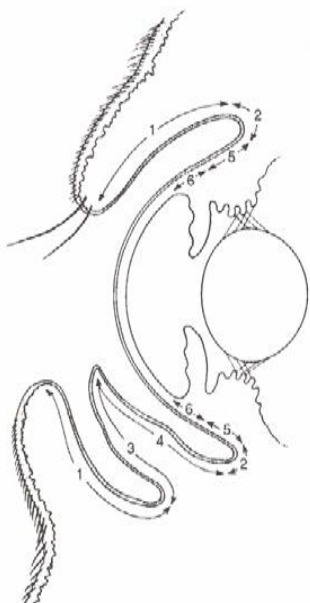
Ocupa o espaço situado entre o cristalino e a retina, comprimindo-a contra a coróide. Consiste numa massa de consistência gelatinosa, que adquire a forma da cavidade, formada por água e por um estroma de fibras delicadas, sendo o seu volume constante (Gelatt, 2007).

c) Órgãos acessórios do olho

Figura nº 4 -

Áreas da conjuntiva

(Adaptado de Slatter, 2001)



O globo ocular está rodeado por diversos órgãos anexos que contribuem para a sua protecção e perfeito funcionamento, sendo eles: as fáscias orbitárias, os músculos extra-oculares, as pálpebras, o aparelho lacrimal e a conjuntiva. A conjuntiva, representada na figura nº 4, é uma membrana mucosa que reveste a superfície posterior das pálpebras (conjuntiva palpebral) e reflecte-se sobre a face anterior do globo até ao limbo esclero-corneano (conjuntiva bulbar), forrando a terceira pálpebra, uma prega em forma de semi-lua suportada por uma fina lâmina de cartilagem. A conjuntiva está ricamente vascularizada por ramos das artérias palpebrais e das artérias ciliares anteriores

Legenda:

1 – conjuntiva palpebral; 2 – fórnix conjuntival; 3 – face anterior da terceira pálpebra; 4 – face posterior da terceira pálpebra; 5 – conjuntiva bulbar; 6 – conjuntiva limbal

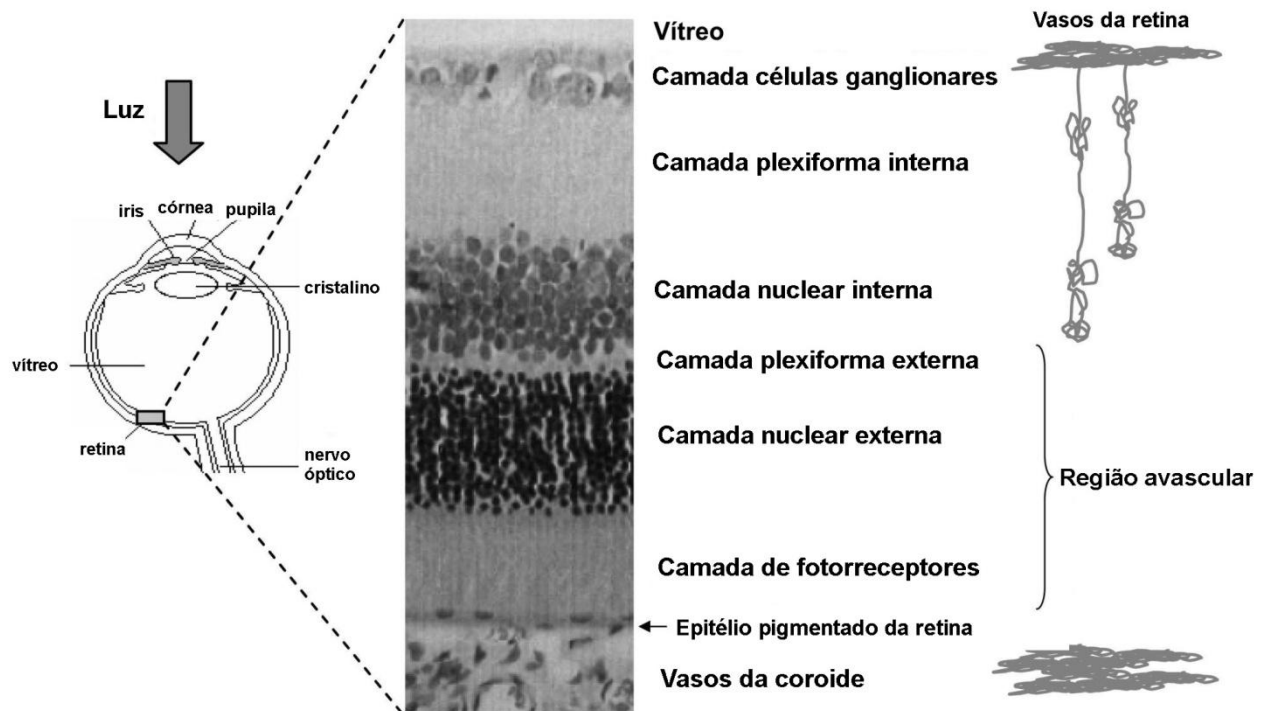
d) Vascularização da retina

A vascularização da retina é assegurada por duas fontes: a circulação retiniana e a circulação coroideia. Os vasos da circulação retiniana existem dentro da camada de células ganglionares, da camada plexiforme interna, da camada nuclear interna e da camada plexiforme externa (Duong et al., 2008). Os vasos da circulação coroideia estão ausentes na retina neural, mas estão localizados posteriormente à camada de fotorreceptores, entre o epitélio pigmentado da retina e a esclera. Assim, a camada nuclear externa e os segmentos internos e externos dos fotorreceptores são avasculares, estando a sua nutrição e oxigenação asseguradas pela difusão a partir da circulação coroideia (Arjamaa & Nikinmaa, 2006).

A Figura nº 5 representa de modo esquemático a nutrição da retina.

Ambas as circulações, retiniana e coroideia, são necessárias para o bom funcionamento da retina, apesar de os fluxos sanguíneos nos vasos da retina e coroide serem regulados por processos diferentes. O fluxo sanguíneo da coroide é várias vezes superior ao fluxo sanguíneo da retina e a sua regulação responde aos mesmos factores de regulação de fluxo sanguíneo sistémico. Pelo contrário, o fluxo sanguíneo da circulação retiniana responde a factores de regulação de fluxo semelhantes aos do cérebro (Arjamaa & Nikinmaa, 2006).

Figura nº 5 – Diagrama esquemático da nutrição da retina (Adaptado de Duong, 2008)



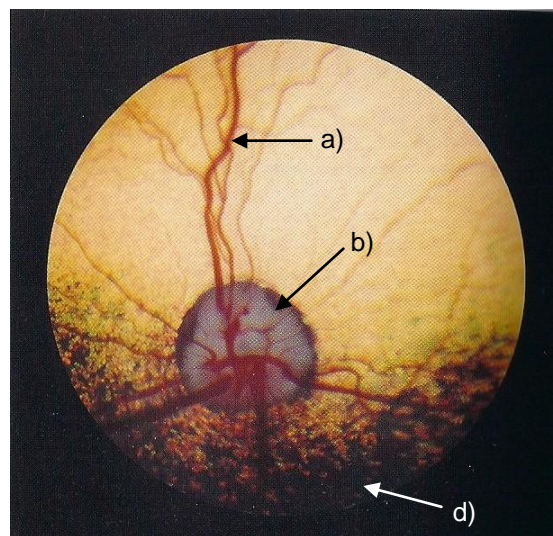
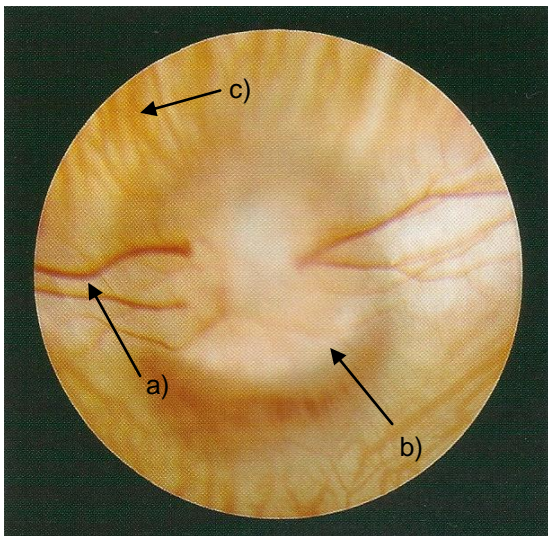
No exame clínico oftalmológico visualiza-se o fundo do olho por oftalmoscopia directa ou indirecta. Neste exame observam-se as estruturas localizadas no segmento posterior do olho, incluindo os vasos da circulação retiniana. As artérias da retina, ramos das artérias ciliares posteriores curtas, penetram através da área crivosa e surgem na periferia do nervo óptico, enquanto que as veias, apesar do seu maior diâmetro, são em menor número. O padrão de distribuição da vascularização varia com a espécie, sendo no coelho do tipo merangiótico e no cão, tal como na maioria dos mamíferos, do tipo holoangiótico (Gelatt, 2007).

A figura nº 6 ilustra, a título de exemplo, a imagem de fundo de olho de um coelho e de um cão.

Figura nº 6 – Imagens de fundo de olho observadas por oftalmoscopia indirecta
(Adaptado de Barnett, 2006)

Figura nº 6 A – Padrão merangiótico, coelho.
Uma banda horizontal de vasos que se estende lateral e medialmente desde o disco óptico.

Figura nº 6 B – Padrão holoangiótico, cão.
Número variável de vasos que irradiam desde a periferia do disco óptico para vascularizar a retina.



Legenda: a) vasos da retina, b) disco óptico e c) vascularização da coroide visível no caso deste coelho devido à ausência de pigmento na retina. No caso deste cão, figura nº 6 B, a vascularização da coroide não é observável devido ao epitélio pigmentado da retina (d)) e o tapete lúcido (toda a área laranja) se localizarem mais cranialmente, sobrepondo-se a essa estrutura.

e) Barreiras hemato-oculares

A barreira hemato-ocular é uma barreira criada pelo endotélio dos capilares da retina, da íris, do corpo ciliar, e do epitélio pigmentado da retina, que controla a passagem de substâncias do sangue para o olho. É uma barreira física entre os vasos sanguíneos e o interior do ambiente ocular, conferindo um critério de selectividade no que respeita à entrada de substâncias (Urtti, 2006). A inflamação pode quebrar essa barreira permitindo que determinadas substâncias e moléculas de maior tamanho penetrem no olho.

É constituída por dois componentes:

1. Barreira hemato-aquosa: localizada nos capilares do corpo ciliar e da íris, impede a troca de material entre o sangue e o humor aquoso presente nas câmaras anterior e posterior do olho.
2. Barreira hemato-retiniana: localizada no endotélio vascular da retina e no epitélio pigmentado da retina, impede a passagem de grandes moléculas da coriocapilaris para a retina.

1.2. Morte celular programada – Apoptose

Apoptose ou morte celular programada é um modo de "autodestruição celular" que requer energia e síntese proteica. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retracção da célula, perda de aderência com a matriz extra celular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossómica do ADN e formação dos corpos apoptóticos. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de activação da apoptose como as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases (moléculas efectoras da cascata da apoptose) (Wenzel, Grimm, Samardzija & Remé, 2005).

As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados.

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das proteases cisteínas (possuem uma cisteína no sítio activo) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear e externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (Wenzel et al., 2005)

Após um sinal de morte celular, as caspases são activadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que

contenham domínios de morte (*death domain*), uma vez que esses domínios também existem nas caspases e a sua presença permite essa interação.

A activação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (Grivicich, I., Regner, A. & Rocha, A., 2007).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligandos específicos a um grupo de receptores da membrana celular da família dos receptores de factores de necrose tumoral. Esta ligação é capaz de activar a cascata das caspases. Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligando específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas que têm a capacidade de recrutarem a caspase-8, que por sua vez, irá activar a caspase-3, executando a morte por apoptose. Os factores extra celulares que podem iniciar um processo de apoptose incluem: toxinas, hormonas, factores de crescimento, o monóxido de azoto ou citoquinas (Grivicich et al., 2007).

A via intrínseca é activada por stress intracelular ou extra celular como a privação de factores de crescimento, danos no ADN, hipoxia ou activação de oncogenes. Os sinais em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador deste tipo de morte. Este organelo integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes, como a activação da pró-caspase 9 e liberação de citocromo c para o meio intracitoplasmático. Uma vez activada, a caspase 9 activa uma série de outras pró-caspases, como por exemplo, a caspase 3, 6 e 7 subsequentemente, clivando estas pró-caspases em substratos menores, resultando numa amplificação do sinal de morte (Grivicich et al., 2007). Nesta fase é possível observar alterações bioquímicas e morfológicas nas células, agora em apoptose (Earnshaw, 1999).

No entanto, os sinais apoptóticos activam também proteínas reguladoras que permite que o processo seja interrompido caso a célula não precise de morrer.

A apoptose é o mecanismo principal de morte celular programada dos fotorreceptores, das células ganglionares da retina (RGC) (Zhong et al., 2007) e das células do epitélio pigmentado da retina (EPR) (Wang et al., 2009) em doenças degenerativas da retina como o glaucoma (Guo et al., 2005), degenerescência macular relacionada com a idade (Wang, Zhao, Song, Shen & Qu, 2009) e retinopatia diabética (Zhong et al. 2007).

1.3. Glaucoma

O glaucoma constitui uma das principais causas de cegueira irreversível no mundo (Resnikoff et al., 2004), sendo responsável por elevadas taxas de morbidades, absentismo laboral, criando dependência total dos pacientes em relação aos seus cuidadores e traduzindo-se num problema muito importante em termos económicos e de saúde pública. Também em medicina veterinária o glaucoma constitui a causa mais frequente de cegueira no cão, surgindo geralmente numa situação clínica avançada por dificuldades no seu diagnóstico atempado, apresentando-se o animal com um olho cego. Urge então começar a tratar imediatamente o olho contra lateral.

O principal factor de risco nesta doença ocular é o aumento da pressão intra-ocular (PIO) que se caracteriza por lesão do nervo óptico com progressiva perda de visão, devido à morte por apoptose das células ganglionares da retina (RGC) (Quigley et al., 1995), tornando-o primariamente num processo neurodegenerativo (Zhong et al. 2007).

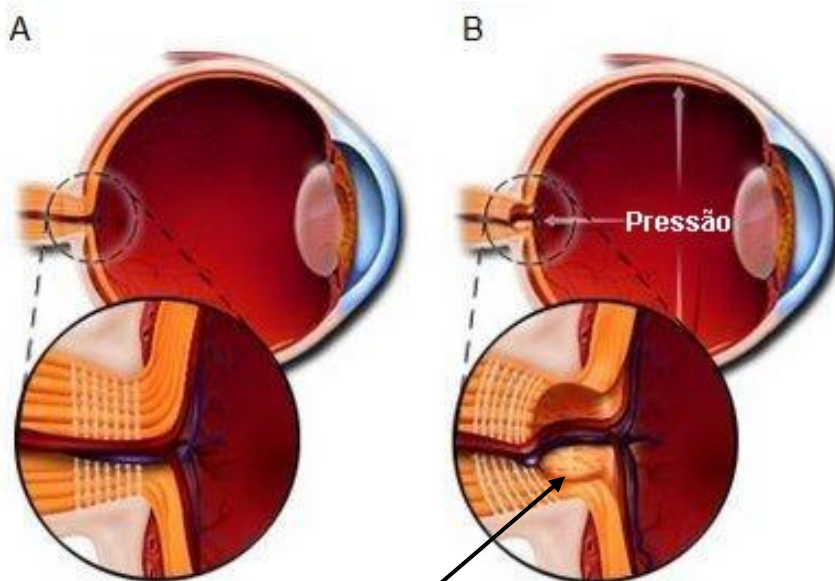
O glaucoma, que ocorre tanto no homem como nos animais de companhia, pode ser classificado como primário ou secundário. O glaucoma primário é determinado geneticamente e ocorre sem antecedentes ou doença ocular concomitante, sendo quase sempre bilateral, embora não surja necessariamente ao mesmo tempo. É causada por alterações anatómicas e/ou fisiológicas que ocorrem na rede trabecular do ângulo iridocorneal. O glaucoma secundário surge na sequência de uma doença ocular que provoca obstrução da circulação e saída do humor aquoso. No homem o glaucoma secundário ocorre como uma complicação de várias condições médicas, como cirurgia ocular, catarata avançada, lesões oculares, uveites, diabetes ou uso de corticosteroides, enquanto que no cão é secundário à luxação do cristalino, uveite, hemorragia intra-ocular, catarata intumescente, neoplasia ou melanose ocular (glaucoma pigmentário).

Existem também casos de glaucoma congénito, uma doença genética rara que atinge recém-nascidos devido à sua diminuta permeabilidade da rede trabecular.

O aumento da PIO resulta na compressão das estruturas intra-oculares. A compressão exercida compromete a vascularização da retina, induz a apoptose das RGC e provoca o “cupping” do nervo óptico ao nível da papila, uma vez que nesse local, área crivosa, a esclera é menos resistente.

A figura nº 7 representa esquematicamente o efeito do aumento da pressão intra-ocular ao nível do nervo óptico.

Figura nº 7 – Efeito do aumento da pressão intra-ocular sobre a retina e o nervo óptico.
(Adaptado de North Cincinnati Eye Care, 2008)



Legenda: A – Olho normal; B – Olho com glaucoma exibindo “cupping” do nervo óptico (seta negra).

No homem, ao contrário do que sucede nos cães e nos gatos, está descrito um glaucoma de pressão normal, em que se verificam as mesmas alterações no nervo óptico não associadas a um aumento da PIO, designando-se por glaucoma de PIO normal. Neste tipo de glaucoma, outros factores, como perturbações no fluxo sanguíneo no nervo óptico, podem interagir com a PIO e afectar o nervo óptico.

Uma consequência quase inevitável do glaucoma, em todas as espécies, é a perda da capacidade visual que atinge primeiro a visão periférica. Se a doença não for tratada, o campo visual diminui progressivamente até que afecta a visão central e culmina na cegueira do olho afectado.

Em termos clínicos, em medicina veterinária, o glaucoma compreende 5 estadios de evolução:

1. Evento inicial ou série de eventos
2. Obstrução da drenagem do humor aquoso
3. Diminuição da irrigação sanguínea axoplásmica
4. Disfunção das células ganglionares da retina: degenerescência do nervo óptico e atrofia
5. Perda do campo visual e cegueira

Na figura nº 8 pode observar-se uma imagem de fundo de olho de um cão saudável e de um cão com um glaucoma de estadio 5. Observe-se na figura nº 8 B o “cupping” e degenerescência do nervo óptico, a diminuição da vascularização retiniana e a hiperreflectividade da área tapetal (devido à morte das células da retina e consequente diminuição da espessura da neuroretina, o reflexo do tapete lúcido é mais evidente).

Figura nº 8 – Imagens de fundo de olho de um cão saudável e de um cão com glaucoma
(Adaptado de Barnett, 2006)

Figura nº 8 A – Fundo de olho saudável

Na imagem pode observar-se o disco óptico de bordos bem definidos e coloração normal, a vascularização retiniana e o reflexo do tapete lúcido com aparência normal.

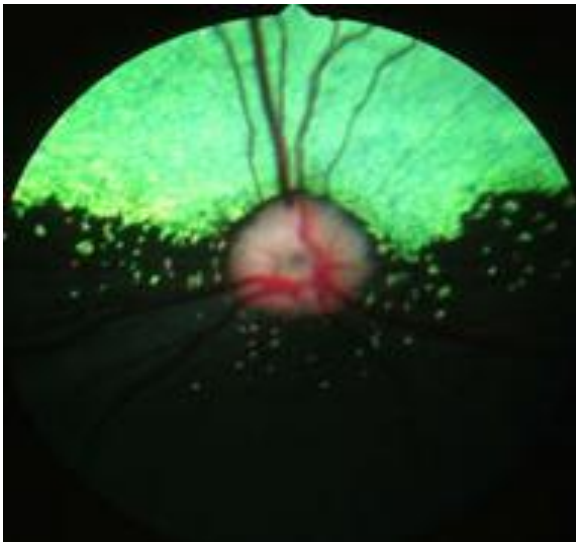
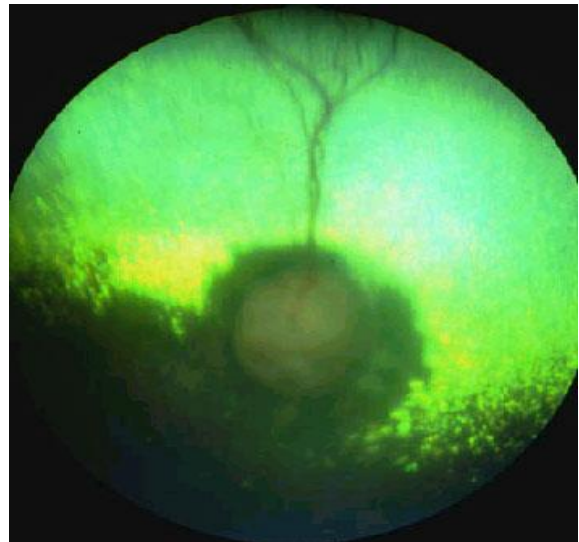


Figura nº 8 B – Fundo de olho com glaucoma

Notar o “cupping” e degenerescência do nervo óptico (pelo alô escuro que o envolve e perda de definição), a diminuição da vascularização retiniana e a hiperreflectividade da área tapetal.



A apresentação clínica do glaucoma depende de vários factores, como a rapidez com que surgiu a doença, o grau de aumento da PIO, a duração do problema, a causa subjacente ao glaucoma e também a idade dos pacientes. Os pacientes mais jovens, por exemplo, pelo facto de possuírem uma esclera mais elástica, desenvolvem mais rapidamente buftalmia, quando comparados com os pacientes adultos nos quais este sinal clínico se desenvolve mais tardiamente.

Os sinais clínicos de glaucoma agudo no cão e no gato traduzem-se por dor, observável pelo blefarospasmo destes pacientes; edema da córnea; midríase, muitas vezes arreflectiva, apresentando-se os animais com a pupila fixa e dilatada; congestão episcleral, mais

acentuada no cão do que no gato, e por fim, perda de visão e cegueira, já anteriormente mencionada.

No caso de glaucoma crónico, logo com mais tempo de evolução, os animais apresentam frequentemente buftalmia, por vezes acompanhada de ulceração corneal; neovascularização da córnea; pode também observar-se estrias de Haab's, que correspondem a fracturas da membrana de Descemet devido ao aumento da PIO; estafiloma equatorial e atrofia da íris.

Do ponto de vista terapêutico, são escassas as opções de que o clínico dispõe para tratar as doenças degenerativas da retina de etiologia não exsudativa (Tsai, 2008), tanto no homem como nos animais. No caso do glaucoma, os tratamentos médicos e cirúrgicos que conduzem à diminuição da pressão intra-ocular (PIO) são os únicos que demonstraram eficácia na prevenção da morte por apoptose das RGC, tornando-se imperativo o desenvolvimento de estratégias neuroprotectoras para prevenir a perda destas células. Em consequência disto, muito se tem investigado nos últimos anos no sentido de descobrir agentes farmacológicos potencialmente neuroprotectores das RGC que evitem a progressão destas doenças. Assume a maior importância para a comunidade científica a procura de terapêuticas alternativas que contribuam para a manutenção da visão nestes pacientes.

A figura nº 9 ilustra casos de pacientes com glaucoma primário, secundário e congénito, tanto agudo como crónico.

Figura nº 9 – Animais com glaucoma

Figura nº 9 A – Glaucoma primário agudo, cão, Cocker Spaniel. (foto gentilmente cedida pela Professora Dr^a. Esmeralda Delgado, 2008)

Note-se a congestão episcleral marcada e a midríase.

Figura nº 9 B – Glaucoma primário crónico, cão, Basset Hound (Original da autora, 2009)

Nesta figura é observável a congestão episcleral marcada, acompanhada de edema da córnea, já com deposição de pigmento que atesta a antiguidade da doença.

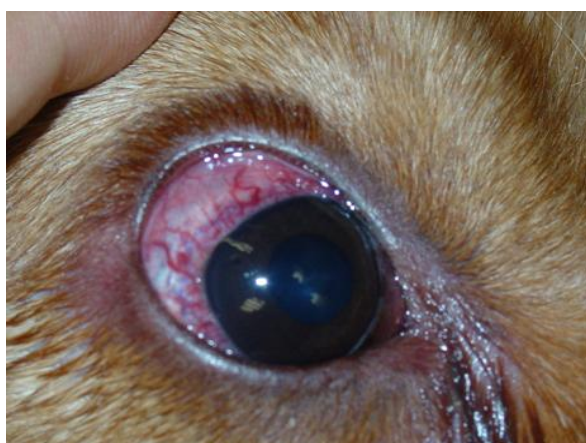


Figura nº 9 – Animais com glaucoma (continuação)

Figura nº 9 C – Glaucoma congénito, gato, Bosque Noruega (foto gentilmente cedida pela Professora Dr^a. Esmeralda Delgado, 2008)
Notar a buftalmia do olho direito, com edema e neovascularização da córnea.



Figura nº 9 D – Glaucoma, equino (Adaptado Barnett, 2006). Na figura são visíveis as estrias de Haab's (seta negra), que correspondem a fracturas da membrana de Descemet devido ao aumento da PIO.

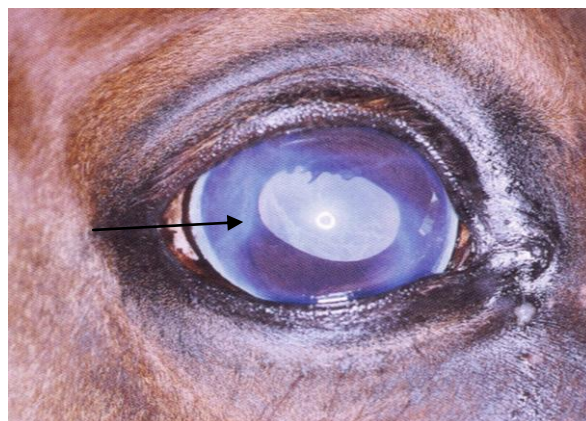


Figura nº 9 C – Glaucoma secundário a luxação anterior do cristalino, cão, Basset Hound (foto gentilmente cedida pela Professora Dr^a. Esmeralda Delgado, 2008) Notar a congestão episcleral, edema e neovascularização da córnea.



Figura nº 9 C – Glaucoma secundário a luxação anterior do cristalino, gato, Europeu comum (Original da autora, 2009). Na imagem é visível a presença do cristalino na câmara anterior, que constituindo um obstáculo à drenagem do humor aquoso, provoca um aumento da PIO. Notar o edema e neovascularização da córnea.



1.4. Eritropoietina

A EPO, uma glicoproteína de 34 kDa, foi inicialmente caracterizada como um factor de crescimento hematopoiético que regula a produção de eritrócitos em resposta a estados de hipoxia (deficiente oxigenação sanguínea) (Song et al., 2008). A EPO é produzida pelas células peritubulares do rim do adulto e pelos hepatócitos do feto. Pequenas quantidades de EPO extra-renal são produzidas pelo fígado no adulto (Jelkmann, 2004).

Uma baixa concentração de oxigénio (pessoas que vivem nas altitudes), a diminuição do número de eritrócitos causada por uma hemorragia ou por uma destruição excessiva ou o aumento da necessidade de oxigénio pelos tecidos levam a um aumento da produção de eritropoietina. Pelo contrário, o excesso de oxigénio nos tecidos diminui a sua produção.

A EPO liga-se a um receptor (EPOR), da superfície das células precursoras de glóbulos vermelhos, que inclui uma cadeia p66, e uma vez activada, esta proteína p66 torna-se dimerizada. A activação do receptor da EPO induz a JAK2 tirosina quinase que leva à fosforilação do receptor da EPO e de várias proteínas. Uma vez accionado, o receptor da EPO activa-se a via intracelular quinase Ras/mitogénio dependente que está envolvida no processo de proliferação celular e na transcrição de factores como fosfatidilinositol 3-quinase, STATS 1, 3, 5A e 5B. A EPO actua em primeiro lugar para evitar a apoptose dos eritrócitos e aumentar o seu tempo de vida. Em sinergismo com vários factores de crescimento (SCF, GM-CSF, IL-3 e IGF-1), a EPO leva à maturação e proliferação de células precursoras de eritrócitos (Fisher, 2003).

A EPO é usada no tratamento adjuvante de certas anemias, devido à sua capacidade de estimulação da eritropoiese medular e, como tal, de aumentar a massa circulante de eritrócitos. Correntemente utiliza-se em pacientes com anemia associada à insuficiência renal crónica, pacientes com doenças oncológicas, doenças hematológicas, programas de transfusão de sangue autólogo e cirurgia ortopédica programada.

Em 1990 foi descrito, pela primeira vez, a existência de EPOR em tecidos fora do rim e da medula óssea e demonstrou-se que a EPO e os seus receptores podem também ser regulados em função do stress (Fisher, 2003). Estudos posteriores realizados em modelos animais de lesão neural demonstraram que a EPO possuía propriedades neuroprotectoras de tecidos, paralelamente às suas funções hematopoiéticas, até então desconhecidas (McPeherson & Juul, 2008). O interesse que a EPO desperta por esta altura na comunidade científica levou a novas e interessantes descobertas, nomeadamente a existência de receptores de EPO em células nervosas, como neurónios, RGC e asterócitos (Bocker-Meffert et al., 2002) e que a EPO podia ser produzida no sistema nervoso central, funcionando como agente neuroprotector e neuroregenerativo (Weishaupt et al., 2004).

Desde então, a administração exógena da EPO e seus derivados tem sido utilizada no tratamento de acidentes vasculares cerebrais no homem e têm sido estudadas as suas aplicações em modelos animais de doenças tais como: lesão da medula espinhal, encefalomyelites auto-imunes, neuropatia diabética, insuficiência renal, lesão do nervo ciático e isquemia do miocárdio (Tsai, Song, Wu & Forbes, 2007).

Contudo, só em 2002 os efeitos benéficos da EPO na área de oftalmologia começaram a ser investigados, quando Grimm et al (2002) demonstraram, num modelo animal de degenerescência da retina induzida pela luz, que tanto a indução endógena da EPO pela retina em hipóxia, como a administração sistêmica de EPO exógena, protegem as células da retina. Chung et al (2009) verificaram nos seus estudos *in vitro*, que a EPO protegia as células do epitélio pigmentado da retina de processos de apoptose e que em condições de stress para a retina, como luz, hiperóxia e aumento da concentração de peróxido de hidrogénio, aumentava a expressão de EPO e dos seus receptores nestas culturas celulares.

Rapidamente, foram desenvolvidos vários estudos que demonstraram o efeito neuroprotector da EPO. Tsai et al (2005) demonstraram que uma única administração intravítrea de 200 ng (equivalente a 20 UI) de EPO é eficaz como agente neuroprotector num modelo de animal de glaucoma. Num estudo posterior, Hwang e os seus colaboradores (2006) demonstraram que uma administração intravítrea de 625 ng (62.5 UI) de EPO não conduziu à ocorrência de efeitos tóxicos na retina de roedores. Provou-se que a EPO protege as RGC do glutamato e óxido nítrico (Yamasaki, 2005) que estão implicados nas doenças oculares causadas por hipóxia e isquemia, tal como a retinopatia diabética (Zhu, Wang, Gu & Xu, 2008) e outras doenças degenerativas (Zhong, 2007).

Actualmente considera-se a EPO uma molécula com potencial de utilização terapêutico no combate à morte celular programada (apoptose) das células nervosas, prevenindo a activação da caspase-3 e outras moléculas (Weishaupt et al., 2004). Para além do seu efeito anti-apoptótico, a EPO actua como reversor do vasoespasma, modulador da inflamação e recrutamento de “stem cells” (Tsai, Wu, Worgul, Forbes & Cao, 2005).

Por estas razões, a EPO é considerada por vários autores uma opção terapêutica promissora para doenças isquémicas da retina que actualmente são as principais responsáveis por casos de cegueira irreversível no mundo (Tsai, 2008).

Apesar de a administração sistêmica de Eritropoietina recombinante humana (rhEPO) ser normalmente segura e eficaz no tratamento da anemia crónica, a sua utilização em pacientes não anémicos por esta via está associada a potenciais efeitos secundários tais como policitemia e outras complicações associadas ao aumento do hematócrito (Song et al., 2008).

A administração local de EPO apresenta-se como um compromisso interessante pois, para além de minimizar os efeitos secundários das administrações sistémicas, permite o efeito neuroprotector benéfico que a EPO pode ter no órgão alvo, a retina.

1.5. Vias de administração de fármacos para o olho

O sucesso da resposta às terapêuticas instituídas em casos de doenças oculares está correlacionado com a concentração de substância activa que atinge as regiões alvo do olho, denominado biofase.

Na terapia ocular, a escolha dos medicamentos a utilizar não se baseia apenas no potencial farmacodinâmico da substância mas também nas suas propriedades farmacocinéticas. A escolha da via de administração mais adequada e da posologia são essenciais para assegurar a presença de uma concentração da substância eficaz na região alvo, por um período adequado, limitando a difusão do fármaco para outras estruturas oculares ou partes do corpo (Furrer et al., 2008).

A administração de medicamentos eficazes para o olho é uma tarefa difícil porque o olho é um órgão único com mecanismos de protecção tanto funcionais como estruturais. Mecanismos como o pestanejar, o lacrimejamento permanente e a drenagem lacrimal, que são necessárias para preservar a acuidade visual, também favorecem a remoção rápida das substâncias que são aplicadas na superfície ocular. O globo ocular está protegido por duas estruturas resistentes, a esclera e a córnea que o isolam o seu interior não só de produtos químicos nocivos como substâncias usadas na terapêutica (Loftsson et al., 2008). Além disso, as estruturas intra-oculares estão isoladas anatomicamente da circulação sistémica pelas já referidas barreiras hemato-oculares. Estas estruturas são fundamentais para a manutenção da homeostase dos meios oculares, essenciais para a sua transparência, mas também agem como obstáculo importante para o acesso de fármacos quer por via tópica quer por via sistémica para os tecidos alvo intra-ocular (Urtti, 2006).

Os principais factores a serem considerados na escolha da via de administração do fármaco para o olho incluem:

- a) a capacidade de atravessar as camadas externas do globo ocular (córnea, conjuntiva e esclera) ou as barreiras hemato-oculares para atingir um local alvo intra-ocular;
- b) as acções das substâncias administradas em tecidos intra-oculares e os seus efeitos sistémicos, e
- c) a duração da acção dessas substâncias, de forma a minimizar a frequência de administração.

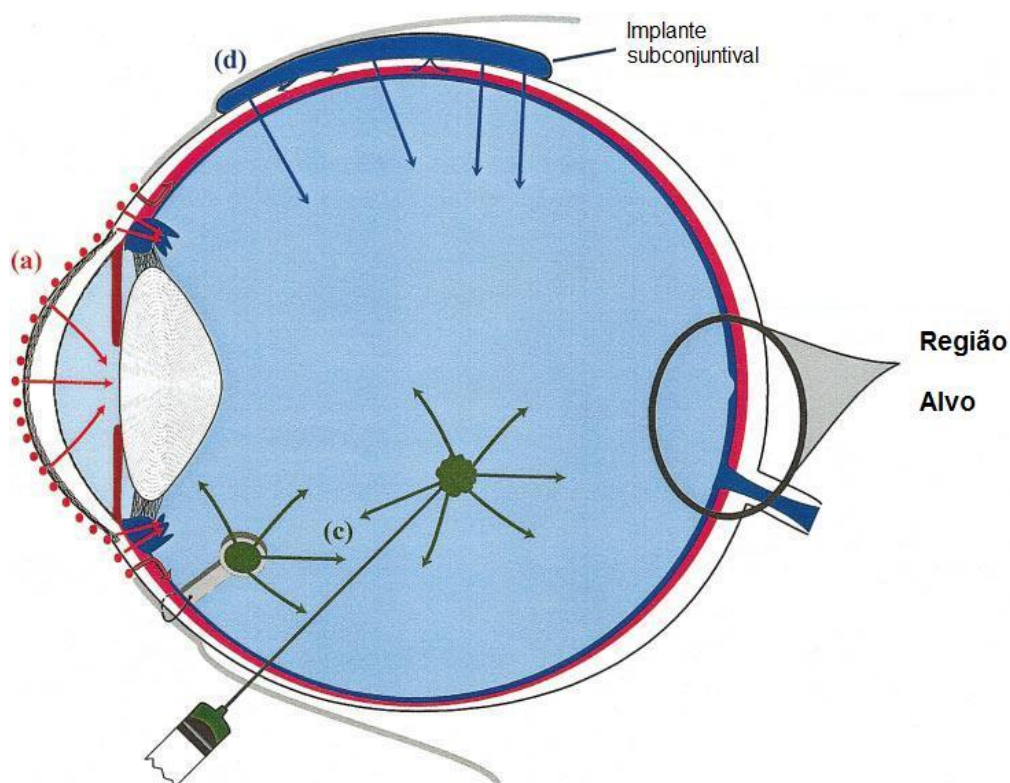
Vias de administração para o segmento posterior do olho

Nos últimos anos, têm decorrido numerosas investigações no sentido de otimizar a administração ocular de fármacos que visem o tratamento de estruturas intra-oculares em doses eficazes para esses tecidos (Gerosk & Edelhauser, 2000).

Quanto à administração de fármacos, estão descritas quatro vias para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho, sendo elas: a via tópica, a via sistémica, a via intra-ocular e a via periocular (que inclui as vias subconjuntival, subcapsular de Tenon e retrobulbar) (Gerosk & Edelhauser, 2000).

Na figura nº 10 representa-se esquematicamente as vias de administração de fármacos com vista à terapêutica de doenças com apresentação no segmento posterior do olho.

Figura nº 10 – Vias de administração de fármacos para o segmento posterior do olho
(Adaptado de Geroski, 1999)



Legenda:

(a) via tópica, sob a forma de colírio oftálmico, necessita de se difundir através da película lacrimal, córnea, íris, corpo ciliar, e vítreo antes de chegar aos tecidos alvo no pólo posterior do olho; **(b) via sistémica**, não representada no gráfico, com um perfil de dose-resposta por vezes baixo devido à barreira hemato-retiniana; **(c) via intravítrea** ou implante e a **(d) via subconjuntival** que se apresenta como uma alternativa eficaz para atingir concentrações terapêuticas na retina.

Via tópica

A grande maioria dos medicamentos utilizados para o tratamento de doenças oculares continua a ser formulada sob a forma de colírios para aplicação tópica na superfície do olho. De entre os factores que podem ditar o insucesso da terapêutica de doenças oculares por via tópica destacam-se: o epitélio da córnea que representa uma forte barreira física ao fluxo de soluções e a rápida eliminação de substâncias assegurada pela drenagem eficaz e o rápido “turnover” da película lacrimal (Mannermaa, 2006). Após a instilação de uma gota de colírio (máximo 30 µL) no saco conjuntival inferior, a substância activa mistura-se com o fluido lacrimal e o tempo de contacto dessa substância com a superfície ocular é em função do lacrimejamento, drenagem de lágrima e “turnover” da película lacrimal e, de certa forma também, da composição do próprio filme lacrimal pré-corneano. Estima-se que, em situações normais, uma substância activa aplicada sob a forma de colírio na superfície ocular apenas uma quantidade inferior a 5% penetra através da córnea e atinge as estruturas intra-oculares. Apesar disto, as formulações tópicas para tratamento de doenças oculares, especialmente as do segmento anterior (câmara anterior e posterior), continuam a ser usadas com eficácia em parte devido à elevada concentração de substâncias activas que estes colírios por norma veiculam (Gerosk & Edelhauser, 2000).

As recentes linhas de investigação no que se refere às formulações tópicas para tratamento de doenças oculares, visam aumentar o tempo de libertação e de contacto da substância activa com a superfície ocular. Actualmente estudam-se novas fórmulas farmacêuticas de pomadas oftálmicas, géis, formulações com liposomas e vários substratos de libertação controlada de fármacos (Del Amo & Urtti, 2008). O desenvolvimento de novos sistemas de libertação tópica de fármacos na superfície ocular que recorrem à utilização de géis poliméricos, sistemas coloidais e ciclodextrinas, abrem excelentes perspectivas no que respeita à utilização tópica de novas substâncias para o tratamento de doenças oculares (Gaudana, Jwala, Boddu & Mitra, 2008).

Os medicamentos aplicados topicamente sobre a córnea (figura nº 10 a) penetram no olho através da conjuntiva e, em seguida, difundem-se pela esclera, mas pelas razões anteriormente citados, esta abordagem tipicamente não se traduz na obtenção de concentrações terapêuticas do fármaco no vítreo posterior, retina ou coróide.

Via sistémica

No que se refere à administração sistémica de fármacos, são normalmente necessárias doses elevadas com o intuito de atingir concentrações terapêuticas no interior do globo ocular, em parte devido às barreiras hemato-oculares: barreira hemato-aquosa (mecanismo

anatômico que impede a troca de material entre o sangue e as câmaras anterior e posterior do olho) e barreira hemato-retiniana (mecanismo anatômico que impede a troca de material entre os vasos da retina e os vasos da coróide, e a retina). Em muitas situações a administração sistémica de concentrações elevadas de determinadas substâncias está associado a efeitos colaterais significativos, como é o caso da EPO.

Via intravítrea

Uma injeção directamente no corpo vítreo (intravítrea) (Figura nº 10 c) é a abordagem mais directa para atingir concentrações terapêuticas no segmento posterior do olho, no entanto, a este procedimento está associado muitas vezes efeitos secundários que, podem por si só, comprometer a capacidade visual do paciente, como: descolamento de retina, hemorragia intra-ocular, endoftalmite e catarata (Gerosk & Edelhauser, 2000). Injeções repetidas são muitas vezes necessárias no tratamento das doenças retinianas atrás mencionadas, o que acarreta riscos elevados para o paciente.

Via periocular

A administração periocular de fármacos, que inclui a via subconjuntival (Figura nº 10 d)) e retrobulbar, tanto sob a forma de injeção como de colocação de dispositivos de liberação controlada, apresenta-se como uma abordagem mais segura e menos invasiva do que a injeção intravítrea para atingir concentrações terapêuticas de fármacos na retina (Gerosk & Edelhauser, 2000).

a) Via retrobulbar

A via de administração retrobulbar, a que actualmente muitos oftalmologistas de medicina humana recorrem para o tratamento de doenças oculares localizados no segmento posterior, é uma técnica de difícil realização nos nossos animais de estimação, uma vez que as diferenças anatómicas da estrutura óssea dificultam o acesso ao espaço retrobulbar na grande maioria deles. Além disso, não é uma técnica isenta de riscos, uma vez que no espaço retrobulbar estão alojadas estruturas importantes como o nervo óptico, as artérias oftálmicas externa e interna, as veias oftálmicas externas dorsal e ventral e o plexo venoso oftálmico, que ficam sujeitos a lesão inadvertida através de uma punção neste local.

b) Via subconjuntival

Quando pensamos na eventual utilização terapêutica da EPO como agente neuroprotector e neurorregenerativo de doenças da retina temos que procurar uma via de administração que seja segura, eficaz, minimamente invasiva e isenta de efeitos secundários.

Estudos recentes indicam que a via de administração subconjunctival pode ser uma alternativa viável para tratamento das doenças do segmento posterior do olho e que, com o desenvolvimento de novos veículos e/ou excipientes utilizados nas suas formulações poderá fornecer novas abordagens terapêuticas (Gaudana, 2008).

Os estudos experimentais realizados até à data que utilizaram a EPO como agente neuroprotector em caso de glaucoma administraram-na pela via sistémica, intravítrea (Tsai, 2008) ou retrobulbar (Zhong, Liu, Cheng & Min, 2008). Estas abordagens não são aconselháveis na prática clínica devido aos seus potenciais efeitos secundários: no caso da via sistémica, nomeadamente o aumento da eritropoiese, no caso da injeção intravítrea, o risco de provocar inadvertidamente descolamentos de retina, hemorragias, endoftalmite e cataratas e no caso da administração retrobulbar o risco de lesão das estruturas que ocupam esse local, atrás mencionadas.

Na revisão bibliográfica efectuada não foram encontradas referências à via subconjunctival para administração da EPO no tratamento de patologias do segmento posterior do olho como o glaucoma, que seriam de aplicação mais fácil aos pacientes tanto humanos como animais.

2. OBJECTIVOS

A morte por apoptose das RGC em situações de hipóxia e isquemia retiniana está descrita em diversas doenças que conduzem à cegueira, incluindo o glaucoma. Além disso os benefícios da EPO nas RGC estão demonstrados por vários estudos. Os efeitos secundários da EPO administrada pela via sistémica em pacientes não anémicos são conhecidos, do mesmo modo que se conhecem as limitações das administrações oculares pelas vias tópica, intravítrea e retrobulbar.

Com este trabalho, propusemo-nos estudar uma via de administração da EPO para o segmento posterior do olho, nomeadamente a retina, que demonstre eficácia, seja minimamente invasiva e que apresente uma baixa taxa de complicações na prática clínica.

Assim, realizámos um estudo da penetração ocular da EPO administrada pela via subconjunctival, em condições fisiológicas, num modelo animal de coelho em que objectivámos 4 pontos:

1. Estudo da concentração vítrea da EPO após administração subconjunctival, para avaliar a penetração ocular da EPO utilizando a via de administração subconjunctival (uma vez que o corpo vítreo é avascular e localiza-se na zona mais interna do globo ocular, para efeitos deste trabalho considera-se que uma substância que atinge o corpo vítreo em determinada concentração, estará na mesma concentração ou superior na retina e vascularização coroideia que o envolvem);
2. Avaliação da concentração plasmática da EPO após administração subconjunctival, para caracterizar o impacto na circulação sistémica e correlacionar com a penetração vítrea da administração subconjunctival de EPO;
3. Análise dos efeitos da administração subconjunctival de EPO no hematócrito ao fim de 7 e 14 dias, para avaliar o eventual aumento da eritropoiese provocado pela injeção subconjunctival e correlacionar com a absorção sistémica da administração subconjunctival de EPO;
4. Estudo dos efeitos da administração subconjunctival de EPO no electrorretinograma (ERG) ao fim de 1 mês, para definir os eventuais efeitos adversos na retina, provenientes de uma administração subconjunctival de EPO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. População em estudo

Foram utilizados seis coelhos albinos Nova Zelândia, com pesos que variaram entre os 2 e os 2,5 kg, adquiridos à Harlan (Harlan Laboratories, Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos em jaulas individuais no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, com água e comida *ad libitum* e com temperatura ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade controlada (ciclos de 12 horas de luz alternando com 12 horas de escuridão).

Uma vez que no decorrer do trabalho foram utilizados modelos animais, foi respeitada a legislação europeia e nacional em vigor respeitante a experimentação animal, com o objectivo de garantir bem-estar animal e minimizar o seu sofrimento.

Figura nº 11 - Animais utilizados no ensaio, coelhos albinos Nova Zelândia



3.2. Procedimentos experimentais

Todos os animais do estudo foram submetidos a um exame oftalmológico completo constituído por exame com lâmpada de fenda (Kowa SL-15, Tóquio, Japão), tonometria para determinar a PIO (TonopenVet, Reichert, Westerville, EUA) e fundoscopia com oftalmoscópio indirecto (Heine Omega 500, Herrsching, Alemanha), em ambos os olhos de cada coelhos: antes da inclusão no estudo; diariamente, durante uma semana após o início do protocolo e no dia 15 e 30 dias do ensaio.

Foi monitorizada durante 15 dias a ocorrência de eventuais complicações, decorrentes dos procedimentos experimentais realizados.

A todos os animais foi colocado um cateter de 24 Gauge na veia marginal da orelha que permaneceu durante 48 horas, e que permitiu tanto as administrações do anestésico como as colheitas de sangue sem sujeitar os animais a punções repetidas.

Os procedimentos experimentais realizados serão seguidamente descritos de forma isolada, apesar de, com o objectivo de otimizar as anestésias e reduzir o número de intervenções a que cada animal foi submetido, alguns terem sido realizados no mesmo momento temporal.

A tabela nº1 ilustra quais os procedimentos experimentais na ordem pela qual foram realizados, em cada momento do ensaio.

Tabela nº 1 – Protocolo experimental adoptado: ordem de realização dos procedimentos experimentais em cada momento do ensaio.

Ordem de realização dos procedimentos experimentais em cada momento do ensaio		0	1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	48	7	15	30
		Horas															Dias		
1	Realização de exame físico geral	X									X					X	X	X	X
2	Realização de exame oftálmico	X									X					X	X	X	X
3	Colocação do cateter na veia marginal da orelha	X															X	X	X
4	Colheita de sangue para tubo seco	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
5	Colheita de sangue para tubo com EDTA	X															X	X	
6	Administração de colírios midriático e anestésico	X			X		X				X				X	X			X
7	Indução e manutenção da anestesia geral	X			X		X				X				X	X			X
8	Realização do ERG	X																	X
9	Colheita de humor vítreo	X			X		X				X				X	X			
10	Injecção subconjuntival de EPO	X																	
11	Remoção do cateter da veia marginal da orelha															X	X	X	X

a) Injecções subconjuntivais

Após a anestesia geral do animal induzida com propofol (Propofol Lipuro®, B Braun Medical Lda., Barcelona, Espanha) 2-8 mg / kg EV e da aplicação de uma gota de anestesia tópica, cloridrato de oxibuprocaina a 0,4% (Anestocil® - Edol, Linda-a-Velha, Portugal) procedeu-se à administração subconjuntival de EPO.

Com uma pinça atraumática (pinça Adson sem dentes) realizou-se uma prega de conjuntiva, e utilizando uma agulha de 25 Gauge acoplada a uma seringa de insulina (1 ml), administrou-se 100 UI de EPO (NeoRecormon 5000®, Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany) diluída em 50 µl solução salina 0,9% num dos olhos de cada animal (n=6).

A presença de uma bolha subconjuntival no local da inoculação era visível imediatamente após as administrações como mostra a figura nº 12.

Os olhos contra-laterais de cada animal serviram de controlo.

Figura nº 12 – Administração subconjuntival de EPO

Figura nº 12 A – Realização da prega de conjuntiva com uma pinça atraumática e introdução da agulha

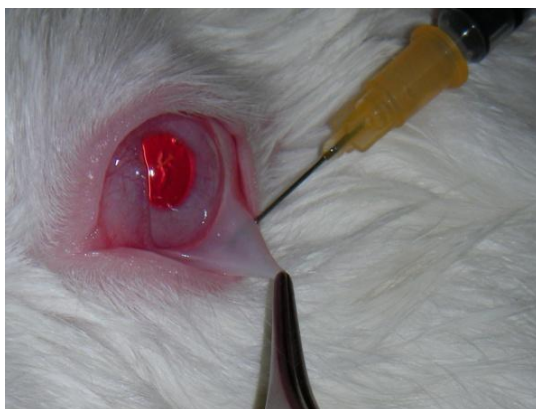


Figura nº 12 B – Depósito de EPO subconjuntival e visualização de bolha após inoculação.

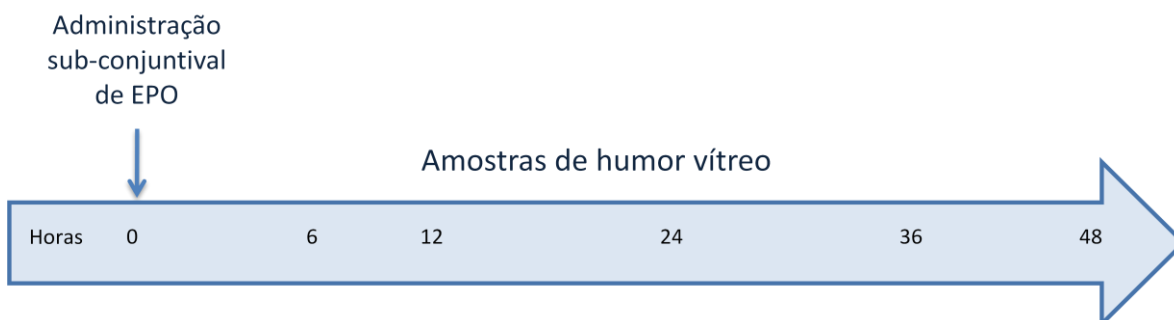


b) Colheitas de humor vítreo para doseamento de EPO

A todos os animais incluídos no estudo foi feita uma colheita de humor vítreo basal no tempo zero do ensaio e foi administrada EPO pela via subconjuntival (como previamente descrito) após o que os animais foram divididos em dois grupos. Ao grupo A foram realizadas colheitas de vítreo às 6, 24 e 48 horas e ao grupo B às 12 e 36 horas após administração subconjuntival de EPO. A opção por este protocolo experimental permitiu a realização de uma curva de absorção com 6 pontos na fita do tempo, da mesma forma que reduziu as

vezes que cada animal foi sujeito à punção vítrea. O gráfico nº 1 representa o protocolo adoptado quanto às horas de colheita de humor vítreo ao longo do tempo.

Gráfico nº 1 – Diagrama dos tempos de colheita de amostras de humor vítreo



Cada punção vítrea foi realizada sob anestesia geral, induzida com propofol e com uma gota de anestesia tópica, como descrito anteriormente. A midríase foi previamente induzida com recurso à tropicamida 1% (Tropicil Top® - Edol, Linda-a-Velha, Portugal). O globo ocular foi estabilizado utilizando duas pinças hemostáticas. Sobre a córnea foi colocada uma lente de vítreo de 12 mm de diâmetro (Acrivet Vit.Lens® - S&V Technologies, Berlim, Alemanha), recoberta com gel oftálmico de ácido poliacrílico 2 mg/g (Vidisic® Gel - Bausch & Lomb, Dafundo, Portugal), que permitiu a visualização de toda a câmara vítrea.

Figura nº 13 – Procedimentos preparatórios à realização de uma punção vítrea

Figura nº 13 A – Preparação para a punção vítrea: administração tópica de colírio midriático (Tropicamida a 1%)



Figura nº 13 B – Preparação para a punção vítrea: administração sistémica do anestésico (Propofol) utilizando o cateter colocado na veia marginal da orelha



Figura nº 13 – Procedimentos preparatórios à realização de uma punção vítrea (continuação).

Figura nº 13 C – Preparação para a punção vítrea: estabilização do globo ocular com duas pinças hemostáticas.

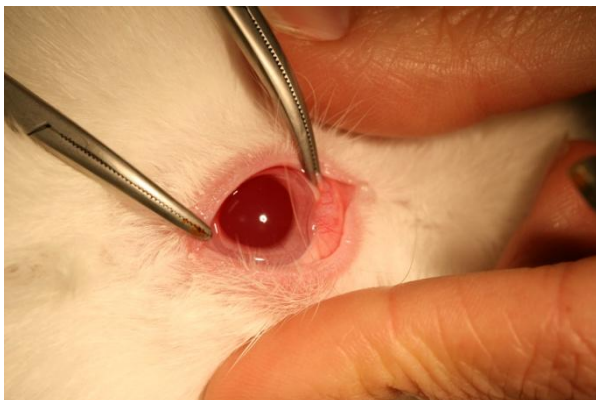


Figura nº 13 D – Preparação para a punção vítrea: preenchimento do interior da lente de vítreo (com gel oftálmico de ácido poliacrílico 2mg/g)



Figura nº 13 E – Preparação para a punção vítrea: colocação da lente de vítreo sobre a córnea.

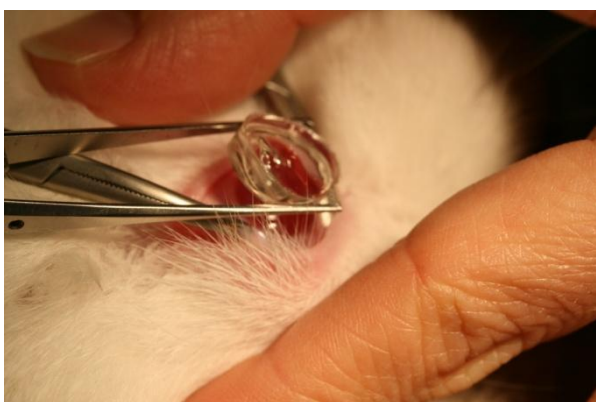
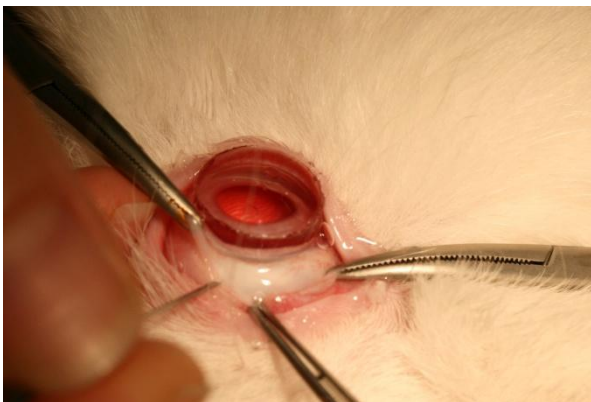


Figura nº 13 F – Punção vítrea: local da punção a 2-3 mm do limbo esclero-corneano. Note-se como é nítida a vascularização do fundo do olho através da lente de vítreo.



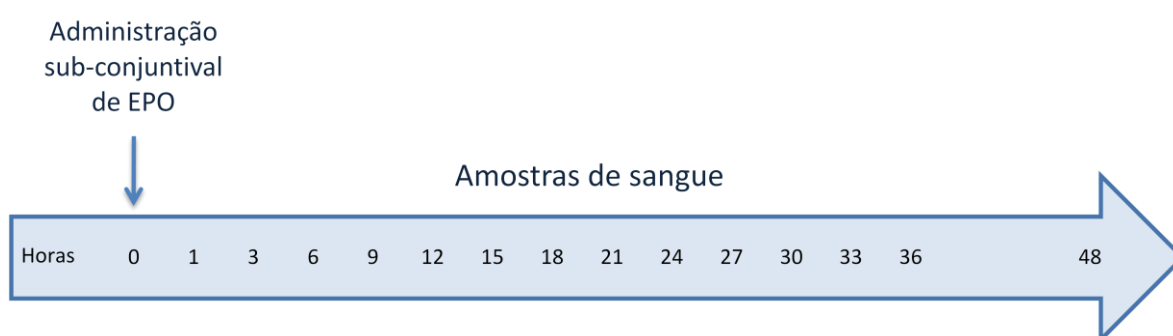
Para cada punção vítrea, foi introduzida uma agulha de 23 Gauge a 2-3 mm do limbo esclero-corneano e, após a visualização da extremidade da agulha na zona central do corpo vítreo, foi aspirado 100 µl de humor vítreo para uma seringa de insulina (1 ml). A mesma quantidade de solução salina estéril 0,9% foi injectada no vítreo com o intuito de repor o volume inicial.

As amostras de humor vítreo recolhidas foram congeladas a -80°C até serem enviadas para o Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra onde foram processadas, e sendo a EPO quantificada através de método ELISA (Cat. Nº. 11693417001, Roche, Mannheim, Alemanha).

c) Colheitas de soro para doseamento de EPO

A concentração sanguínea de EPO basal (tempo zero do ensaio) foi doseada a todos os animais incluídos no estudo, antes da administração subconjuntival de EPO exógena (como previamente descrito). Posteriormente foram realizadas colheitas à 1 hora, e após a colheita inicial de 3 em 3 horas até às 36 horas e novamente às 48 horas após administração subconjuntival. O gráfico nº 2 apresenta-se o protocolo adoptado quanto aos momentos de colheita de sangue ao longo do tempo.

Gráfico nº 2 – Diagrama dos tempos de colheita de amostras de sangue



Para a obtenção de amostras de soro para doseamento de EPO foi colhido 0,5 ml de sangue através do cateter colocado na veia marginal da orelha em cada ponto do desenho experimental.

Figura nº 14 – Colheita de sangue através do cateter localizado na veia marginal da orelha.

Figura nº 14 A – Vista geral.



Figura nº 14 B – Pormenor da localização do cateter na veia marginal da orelha e início da colheita da amostra de sangue.



Nota: para melhor visualização as fotografias foram retiradas antes da colocação dos adesivos para fixação do cateter

As mostras foram colocadas em tubos secos “eppendorf” e centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos. Com o auxílio de uma pipeta “Pasteur” foi extraído o soro e conservado a -80°C até as amostras serem enviadas para o Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra onde foram processadas. A EPO foi quantificada através de método ELISA (Cat. Nº. 11693417001, Roche, Mannheim, Alemanha).

Este método, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), é um teste imunoenzimático que se baseia na interacção antigénio-anticorpo e permite a detecção de anticorpos específicos no plasma ou soro sanguíneo.

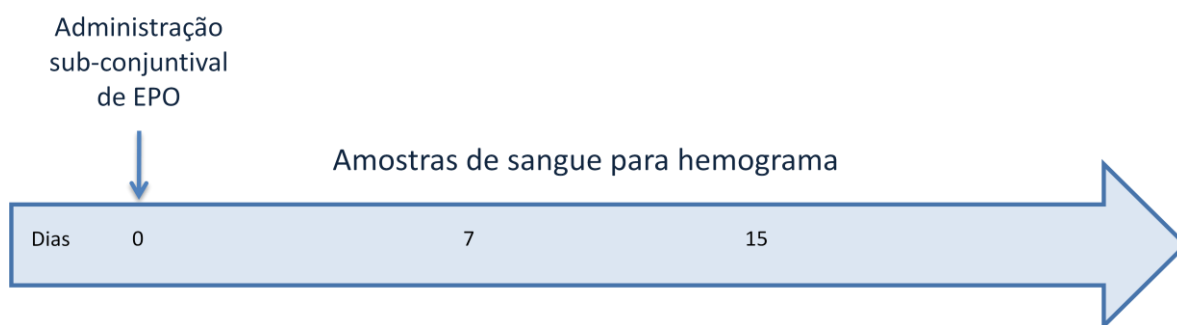
O teste ELISA (Cat. Nº. 11693417001, Roche, Mannheim, Alemanha) é utilizado para detecção de EPO endógena e eritropoietina recombinante humana em estudos de investigação.

É usada uma microplaca de superfície inerte com poços onde, numa primeira fase, a EPO se liga simultaneamente aos anticorpos anti-EPO que revestem a superfície da microplaca e ao anticorpo de detecção. Os anticorpos de detecção possuem uma enzima acoplada que irá produzir uma substância corada. A intensidade da cor, determinada por fotometria, é proporcional à concentração de EPO e permite a apresentação de um resultado quantitativo.

d) Colheitas de sangue para realização de hemogramas

Para cada animal incluído no estudo foi realizado um hemograma no dia 0, no dia 7 e no dia 14 do ensaio e foram analisados os resultados referentes à contagem total de eritrócitos e ao hematócrito. Para tal foi recolhido 1 ml de sangue através do cateter colocado na veia marginal da orelha, para um tubo com EDTA. As amostras foram enviadas para o laboratório de análises clínicas Professor M. Braço Forte da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

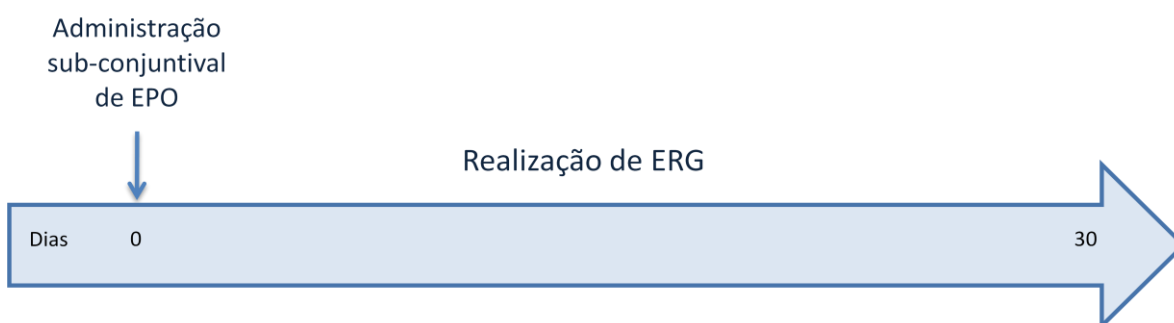
Gráfico nº 3 – Diagrama dos tempos de colheita de sangue para a realização de hemogramas



e) Realização de Electrorretinogramas (ERGs)

Foi realizado um electroretinograma (ERG) a todos os animais do estudo no dia 0 e no dia 30 do ensaio experimental. Para a realização dos ERGs foi utilizado o equipamento Retiport versão 0.5 (Acrivet, Berlim, Alemanha) com o programa Electrophysiologische Diagnostiksysteme (Roland Consult, Berlim, Alemanha). O gráfico nº 4 é uma representação esquemática do protocolo adoptado para a realização dos ERG.

Gráfico nº 4 – Diagrama dos tempos de realização de ERGs



Recorreu-se ao protocolo curto Photopic ERG-LED de acordo com as “Guidelines for Clinical Electroretinography in the dog” (Narfström et al, 2002). Este consiste na avaliação da resposta da retina em condições de luminosidade. Assim, numa primeira fase, utilizou-se uma intensidade luminosa de 0 dB e uma frequência 1,2 Hz (“Photopic luminance responses”) e numa segunda fase utilizou-se uma intensidade luminosa de 0 dB e uma frequência 28 Hz (“Photopic flicker”). O equipamento emite 20 estímulos luminosos para cada uma das frequências e o resultado que apresenta corresponde à média das 20 respostas obtidas.

A midríase foi previamente induzida com recurso à tropicamida 1% (Tropicil Top® - Edol, Linda-a-Velha, Portugal). Cada ERG foi realizado sob anestesia geral, induzida com propofol (Propofol Lipuro®, B Braun Medical Lda., Barcelona, Espanha) 2-8 mg / kg EV administrado através do cateter da veia marginal da orelha e com uma gota de anestesia tópica, cloridrato de oxibuprocaína a 0,4% (Anestocil® - Edol, Linda-a-Velha, Portugal). Os animais foram colocados sobre um colchão isolante para eliminar as interferências das estruturas metálicas envolvente.

Na figura nº 30 pode observar-se o equipamento que foi utilizado durante a realização de um ERG.

Figura nº 15 – Equipamento utilizado para a realização do ERG.

Figura nº 15 A – Vista geral da realização do exame. O coelho está anestesiado sobre um colchão isolante e do lado direito encontra-se o electroretinografo.

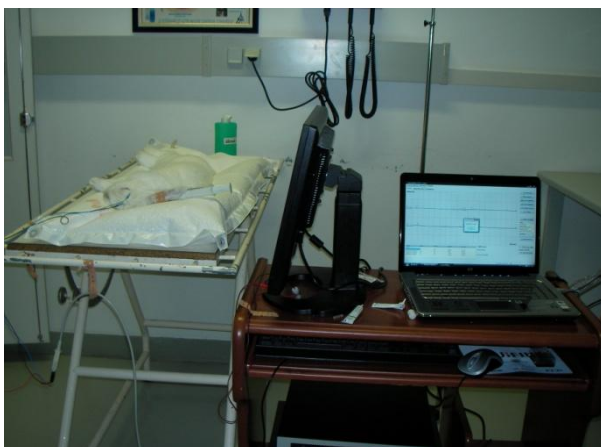
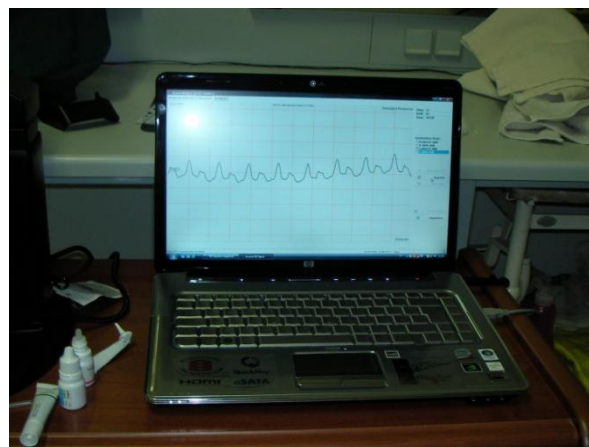


Figura nº 15 B – Pormenor do monitor do electroretinografo com um traçado de registo de ERG.

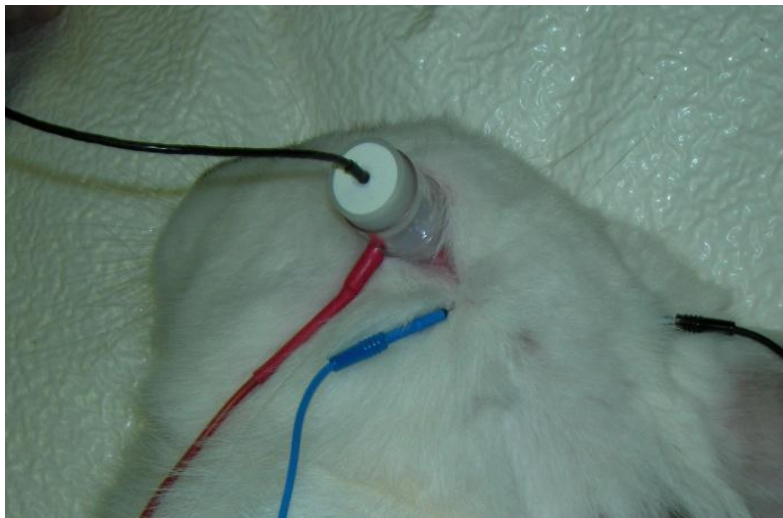


As alterações eléctricas geradas na retina em resposta ao estímulo luminoso foram recolhidas utilizando 3 eléctrodos (Figura nº 16):

1. Eléctrodo de córnea (“Kojiman electrode”), de cor vermelha, que consiste num anel de ouro implantado numa lente de contacto, que foi colocado sobre a córnea e acoplado ao estimulador luminoso (“flash”). A lente foi recoberta com gel oftálmico de ácido poliacrílico 2 mg/g (Vidisic® Gel - Bausch & Lomb, Dafundo, Portugal) para garantir uma boa condutibilidade.
2. Eléctrodo de referência, de cor azul, foi colocado a 1 – 2 cm do canto lateral da fissura palpebral.
3. Eléctrodo terra foi colocado na região occipital. A figura nº 16 ilustra o local de colocação dos eléctrodos para realização do ERG.

Antes do início do exame foi avaliada a impedância para garantir que os eléctrodos, particularmente o eléctrodo de referência e o eléctrodo terra, mantinham um bom contacto com os tecidos. Este procedimento foi realizado através de uma opção disponível no programa informático do equipamento.

Figura nº 16 – Colocação dos eléctrodos para a realização do ERG no coelho anestesiado.
Eléctrodo vermelho – eléctrodo de córnea com o estimulador luminoso acoplado;
eléctrodo azul – eléctrodo de referência e eléctrodo preto – eléctrodo terra.



Os sinais eléctricos gerados na retina após a produção do estímulo luminoso são de baixa amplitude (normalmente menos de 10^{-1} mV) e têm que ser ampliados aproximadamente 10^4 vezes para que possam ser visualizados adequadamente.

Todos os equipamentos eléctricos não directamente envolvidos no exame (ex: telemóveis) são potencialmente geradores de ruído e, como tal, foram desligados durante a execução do mesmo.

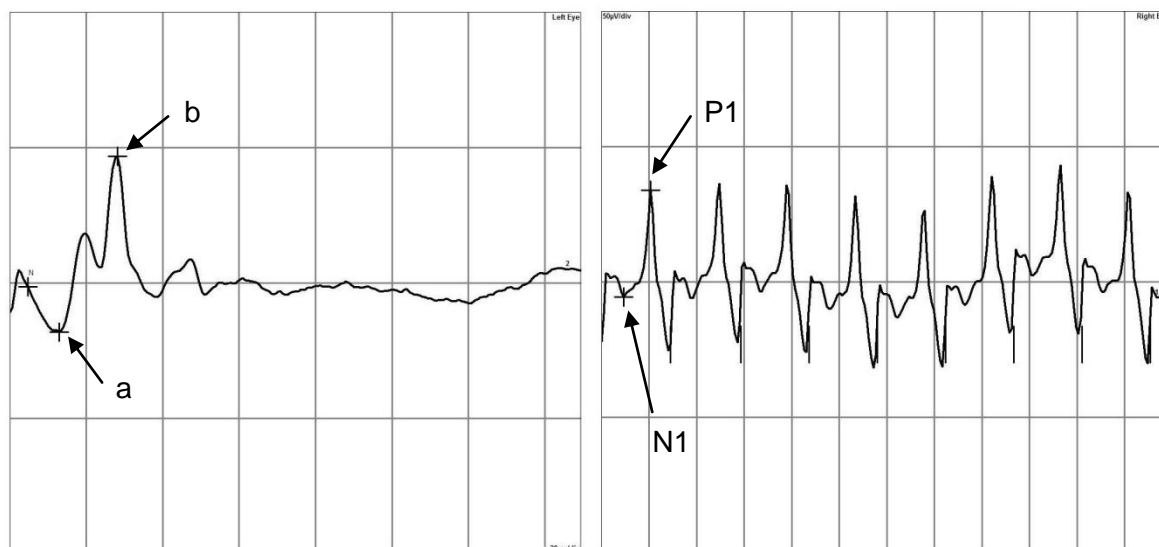
A média dos 20 sinais eléctricos recolhidos permite reduzir o impacto do ruído no registo de ERG. O traçado final de ERG obtido é representado por uma curva, como ilustra a figura nº17, e pode ser visualizado no ecrã do computador.

Na análise deste traçado consideramos os tempos implícitos e as amplitudes das ondas-a e b. Em termos fisiológicos a onda-a corresponde à despolarização dos fotorreceptores (cones e bastonetes) enquanto que a onda-b corresponde à despolarização das células bipolares e de Muller. A amplitude da onda-a é medida desde a linha basal (pré-estímulo) até ao pico da onda-a e por convenção, a onda-b é medida desde o pico da onda-a até ao pico da onda-b. O tempo implícito da onda-a (N1) refere-se ao tempo que decorre entre a produção do estímulo luminoso e o pico da onda-a enquanto o tempo implícito da onda-b (P1) refere-se ao tempo que decorre entre a produção do estímulo luminoso e o pico da onda-b. Os tempos implícitos são medidos em ms (milissegundos).

Figura nº 17 – Registo do ERG.

Figura nº 17 A – Registo de ERG utilizando uma intensidade luminosa de 0 dB e uma frequência 1,2 Hz. As setas indicam a) o pico da onda-a e b) o pico da onda-b.

Figura nº 17 B – Registo de ERG utilizando uma intensidade luminosa de 0 dB e uma frequência 28 Hz. As setas indicam N1) o tempo implícito N1 e P1) o tempo implícito P1.



Para efeitos de avaliação da função retiniana no nosso ensaio foram analisados 3 parâmetros: a amplitude da onda-a, a amplitude da onda-b e o intervalo N1-P1, que corresponde ao intervalo de tempo que decorre entre o tempo implícito da onda-a e o tempo implícito da onda-b.

3.3. Análise estatística dos resultados

As variáveis em estudo foram: a concentração vítrea de EPO, a concentração sistémica de EPO, a contagem total de eritrócitos, o hematócrito e por fim a onda-a, onda-b e intervalo N1-P1 do ERG.

O tratamento estatístico foi realizado com recurso aos programas informáticos GraphPad InStat (San Diego, EUA) e Excell (Microsoft, EUA), sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média. Foi utilizado um teste de “t-student” para dados emparelhados, na análise da variação dos resultados obtidos no hemograma e ERGs, sendo considerado um valor de $p=0,05$ ou menos estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

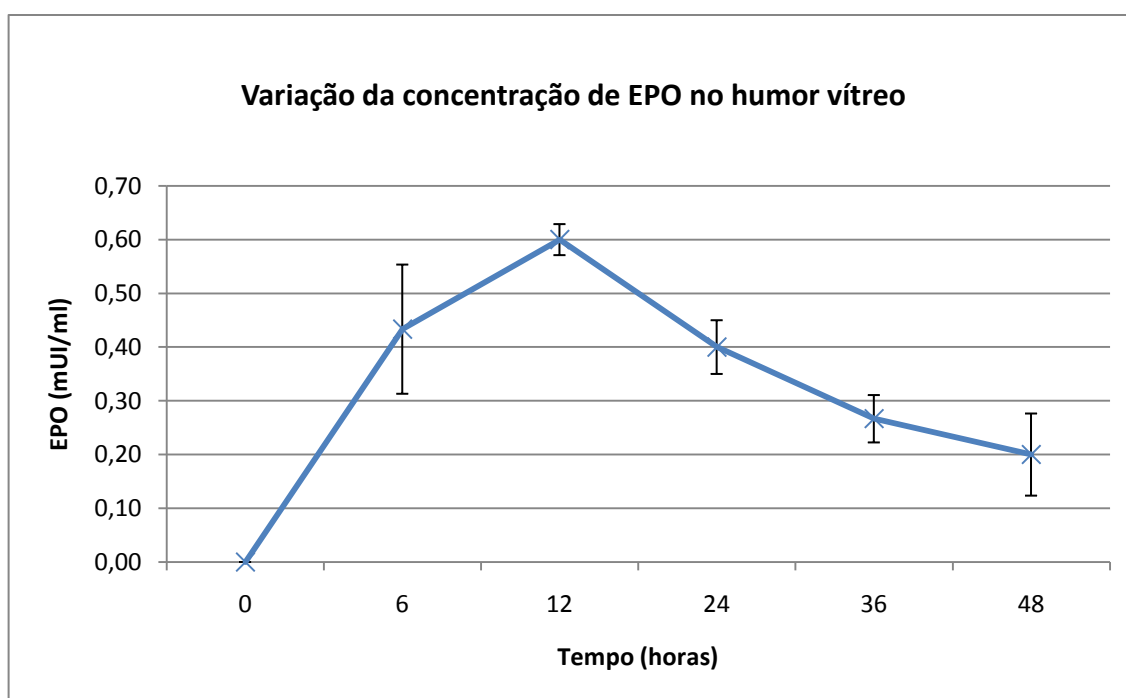
4.1. Absorção vítrea

A administração da EPO pela via subconjunctival permitiu a obtenção de uma curva de absorção vítrea, em todos os animais.

A concentração basal de EPO (às 0 horas) não foi mensurável pela metodologia analítica utilizada, em nenhum dos animais incluídos no estudo. Seis horas após a administração subconjunctival já foi possível quantificar EPO no vítreo obtendo-se um valor de $0,43 \pm 0,12$ mUI/ml. O máximo de concentração de EPO no vítreo observou-se às 12 horas após injeção com um valor de $0,6 \pm 0,06$ mUI/ml quantificada em 100 μ l de amostra de vítreo. Verificou-se posteriormente uma diminuição gradual ao longo do tempo embora às 48 horas após a administração subconjunctival, ainda se detectasse a presença de EPO no vítreo numa concentração de $0,2 \pm 0,15$ mUI/ml.

O gráfico nº 5 ilustra a variação da concentração de EPO no humor vítreo de coelho ao longo do tempo após uma injeção subconjunctival de 100 UI de EPO.

Gráfico nº 5 – Variação da concentração de EPO (em mUI/ml) no humor vítreo de coelho ao longo do tempo (em horas) após injeção subconjunctival.



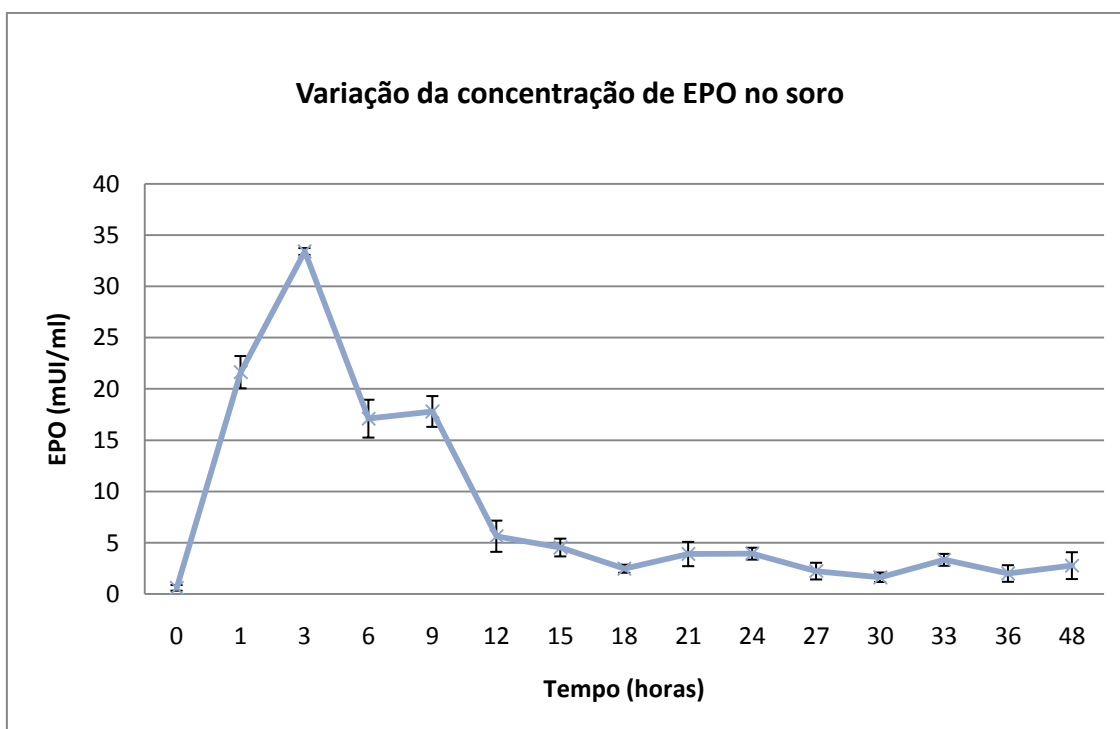
4.2. Absorção sistémica

O valor basal médio da concentração de EPO no soro dos indivíduos em estudo, medido no tempo 0 antes da administração subconjuntival, foi de $0,6 \pm 0,28$ mUI/ml.

A administração de EPO pela via subconjuntival permitiu obter uma curva de concentração sistémica no coelho que atingiu um valor máximo de $33,4 \pm 0,66$ mUI/ml obtida 3 horas após injeção. Seguiu-se uma diminuição progressiva até às 18 horas após injeção, quando atingiu uma concentração plasmática média no valor de $2,4 \pm 0,39$ mUI/ml. Durante o restante período do estudo (das 18 às 48 horas) o valor de EPO foi oscilando entre um valor máximo de $3,9 \pm 1,16$ mUI/ml às 21 horas e um valor mínimo de $1,6 \pm 0,46$ mUI/ml às 30 horas após a administração subconjuntival.

O gráfico nº 6 ilustra a variação da concentração de EPO no soro de coelho ao longo do tempo após a injeção subconjuntival de 100 UI de EPO.

Gráfico nº 6 – Variação da concentração de EPO (em mUI/ml) no soro de coelho ao longo do tempo (em horas) após injeção subconjuntival.



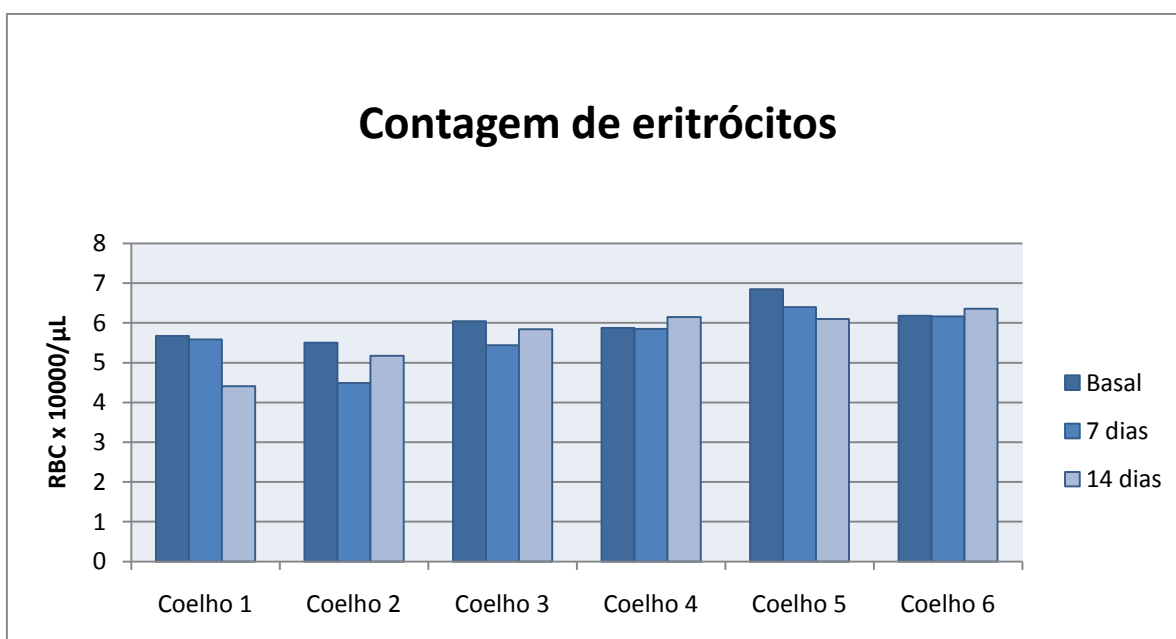
4.3. Hemograma

Os resultados referentes à contagem do número total de eritrócitos e ao hematócrito de cada animal aos 0, 7 e 14 dias foram também analisados. No anexo II pode observar-se um exemplo de uma das folhas dos resultados obtidos no hemograma.

A média de valores correspondentes à contagem de eritrócitos dos animais em estudo (RBC x10000/ μ L) variou entre $6,02 \pm 0,48$ no dia 0 e $5,65 \pm 0,67$ (¥) no dia 7 e $5,67 \pm 0,74$ (†) no dia 14. A comparação dos valores obtidos (¥ $p=0,074$ e † $p=0,948$) permitiu verificar que não existe diferença estatisticamente significativa entre eles.

O gráfico nº 7 representa de forma esquemática a variação observada na contagem de eritrócitos de cada um dos seis coelhos incluídos no estudo aos 0 dias (basal), 7 dias e 14 dias.

Gráfico nº 7 – Resultados da contagem de eritrócitos aos 0, 7 e 14 dias nos 6 coelhos do estudo.

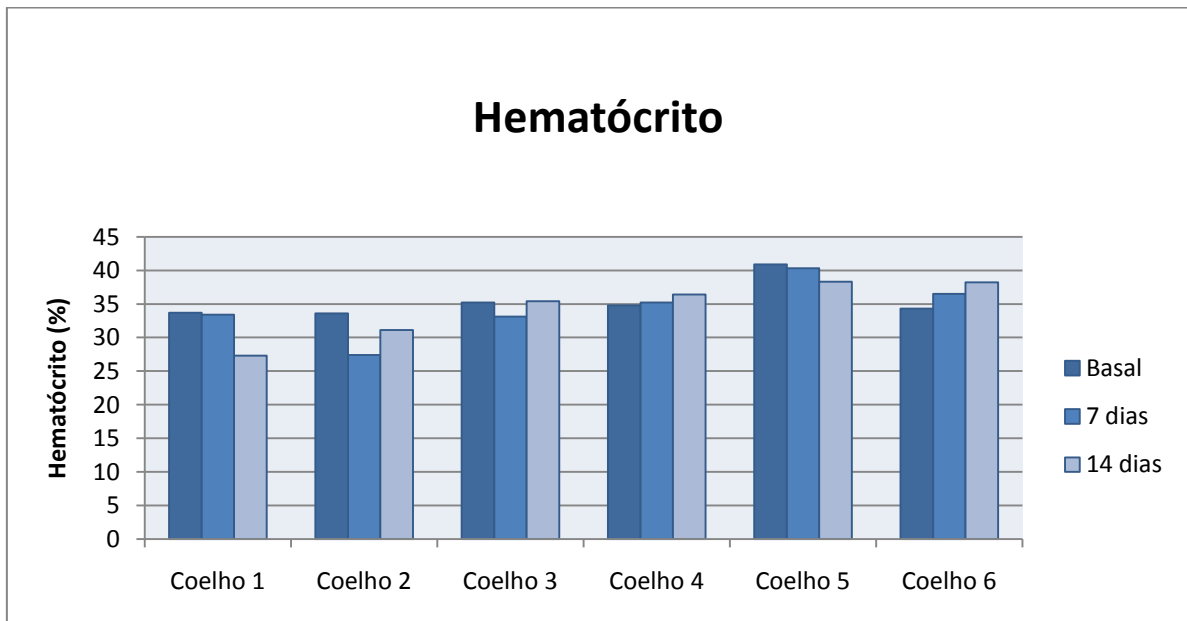


Analisando os resultados de hematócrito verificou-se que os valores variaram entre $35,42 \pm 2,7\%$ no dia 0 e $34,32 \pm 4,3\%$ (†) no dia 7 e para $34,45 \pm 4,4\%$ (¥) no dia 14.

A comparação dos valores obtidos († $p=0,390$ e ¥ $p=0,931$) permitiu verificar que não existe diferença estatisticamente significativa entre eles.

O gráfico nº 8 representa de forma esquemática a variação observada no hematócrito de cada um dos seis coelhos incluídos no estudo aos 0 dias (basal), 7 dias e 14 dias.

Gráfico nº 8 – Resultados do hematócrito aos 0, 7 e 14 dias nos 6 coelhos do estudo.



Foi utilizado um teste de “t-student”, para análise da variação dos resultados obtidos, sendo considerado um valor de $p=0,05$ ou menos estatisticamente significativo.

Logo, no que respeita aos efeitos da EPO administrada pela via subconjuntival, não se verificaram alterações significativas na contagem de eritrócitos nem no hematócrito, nem aos 7 dias nem aos 14 dias após injeção.

4.4. ERG

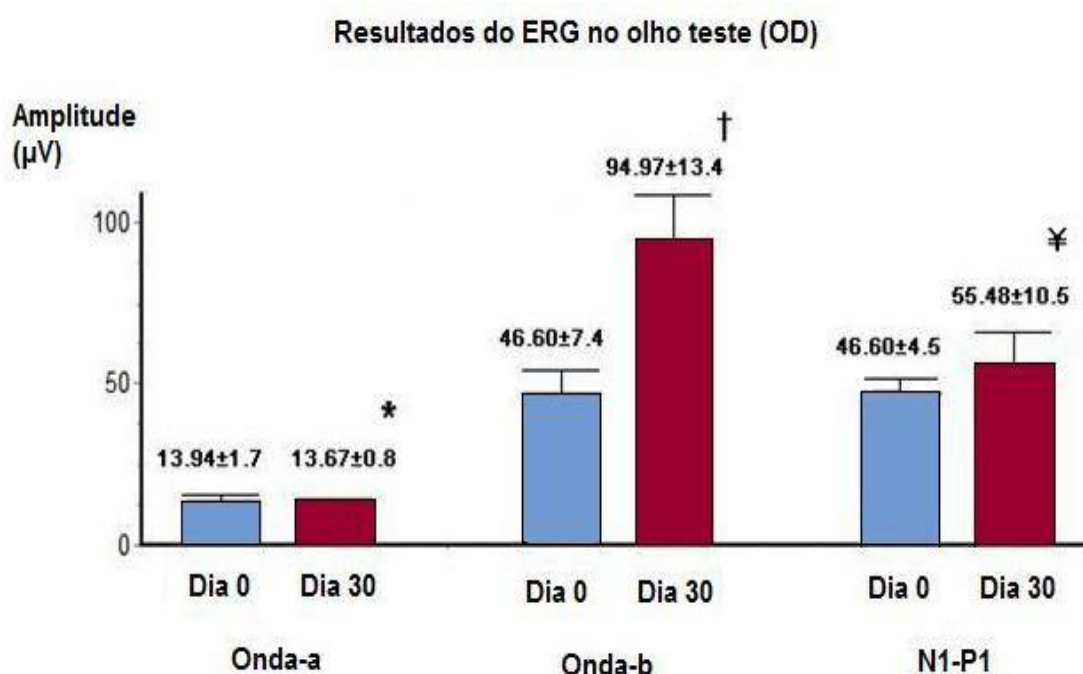
No que se refere ao ERG, foram analisados os resultados referentes à onda-a, onda-b e intervalo N1-P1 de cada animal no dia 0 e no dia 30. No anexo III pode observar-se um exemplo de uma das folhas dos resultados obtidos no ERG.

Assim, verificou-se que no olho utilizado como teste (olho direito) no qual se administrou 100 UI de EPO pela via subconjuntival, os resultados da onda-a dos animais do estudo, registaram um valor médio de $13,94 \pm 1,7 \mu\text{V}$ no dia 0 e $13,67 \pm 0,8 \mu\text{V}$ no dia 30; os resultados da onda-b registaram uma média de $46,60 \pm 7,4 \mu\text{V}$ no dia 0 e $94,97 \pm 13,4 \mu\text{V}$ no dia 30 e por fim os resultados referentes ao intervalo N1-P1 registaram uma média de $46,60 \pm 4,5 \mu\text{V}$ no dia 0 e $55,48 \pm 10,5 \mu\text{V}$ no dia 30.

Analisando os resultados obtidos no olho teste verificamos que não houve alterações significativas na onda-a (*p=0,844) nem no intervalo N1-P1 (¥ p=0,438), quando comparamos as amplitudes registadas no início do ensaio (dia 0) e no final (dia 30). Já no que se refere às amplitudes obtidas no registo da onda-b verificou-se uma diferença significativa (†p=0,031) que se traduziu num marcado aumento (de 49%) verificado no final do ensaio (dia 30) quando comparado com o início do mesmo (dia 0).

O gráfico nº 9 representa esquematicamente os resultados obtidos no ERG do olho teste. Pode analisar-se cada um dos parâmetros em estudo, onda-a, onda-b e intervalo N1-P1 no início do ensaio (dia 0) e no final (dia 30).

Gráfico nº 9 – Resultados dos diferentes parâmetros em estudo do ERG, onda-a, onda-b e intervalo N1-P1, referentes ao olho teste no início (dia 0) e do fim do estudo (dia 30).



Legenda: * - p=0,844; † - p=0,031; ¥ - p=0,438

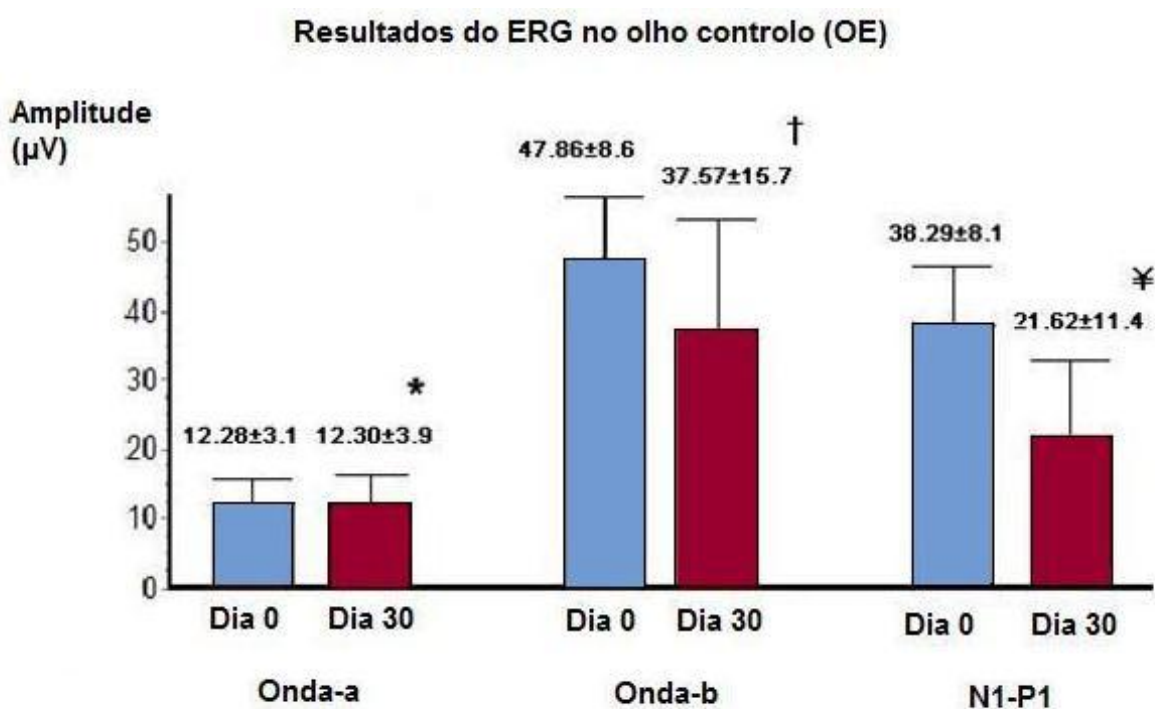
No que se refere aos valores obtidos no olho controlo (olho esquerdo), os resultados da onda-a dos animais em estudo, registaram uma média de 12,28 ± 3,1 µV no dia 0 e 12,30 ± 3,9 µV no dia 30; os resultados da onda-b registaram uma média de 47,86 ± 8,6 µV no dia 0 e 37,57 ± 15,7 µV no dia 30 e, por último, os resultados referentes ao intervalo N1-P1 registaram uma média de 38,29 ± 8,1 µV no dia 0 e 21,62 ± 11,4 µV no dia 30.

Analisando os resultados obtidos no olho controlo verificamos que não houve alterações significativas em nenhum dos parâmetros em estudo, onda-a (*p=0,9976), onda-b

(†p=0.5316) e intervalo N1-P1 (¥ p= 0.1737), quando comparamos as amplitudes registadas no início do ensaio (dia 0) e no final (dia 30).

O gráfico nº 10 representa esquematicamente os resultados obtidos no ERG do olho controlo onde pode analisar-se cada um dos parâmetros em estudo, onda-a, onda-b e intervalo N1-P1 no início do ensaio (dia 0) e no final (dia 30).

Gráfico nº 10 – Resultados dos diferentes parâmetros em estudo do ERG, onda-a, onda-b e intervalo N1-P1, referentes ao olho controlo no início (dia 0) e do fim do estudo (dia 0).

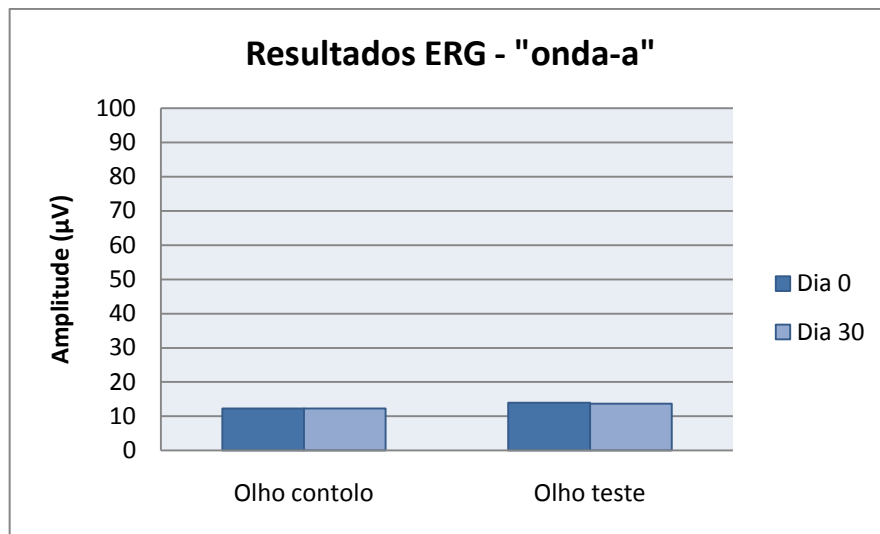


Legenda: * - p=0.9976; † - p=0.5316; ¥ - p=0.1737

Nos três gráficos que se seguem é possível comparar os resultados, já atrás mencionados, de cada um dos parâmetros do ERG, onda-a, onda-b e intervalo N1-P1, mas desta feita, isoladamente.

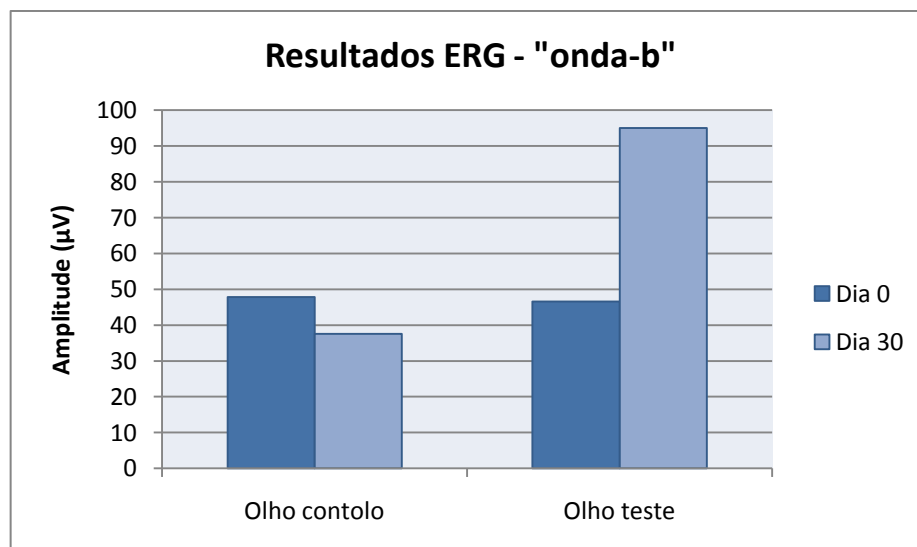
Assim, no que se refere à onda-a verifica-se que não houve alterações significativas quando comparamos os olhos controlo e os olhos teste, no início (dia 0) e no final do ensaio (dia 30), como representa o gráfico nº11. Os resultados da onda-a dos olhos controlo dos animais em estudo registaram uma média $12,28 \pm 3,1 \mu\text{V}$ no dia 0 e $12,30 \pm 3,9 \mu\text{V}$ no dia 30, enquanto que os olhos teste apresentaram um valor médio de $13,94 \pm 1,7 \mu\text{V}$ no dia 0 e $13,67 \pm 0,8 \mu\text{V}$ no dia 30.

Gráfico nº 11 – Resultados do ERG referentes à onda-a no início (dia 0) e no final do estudo (dia 30), nos olhos controlo e nos olhos teste.



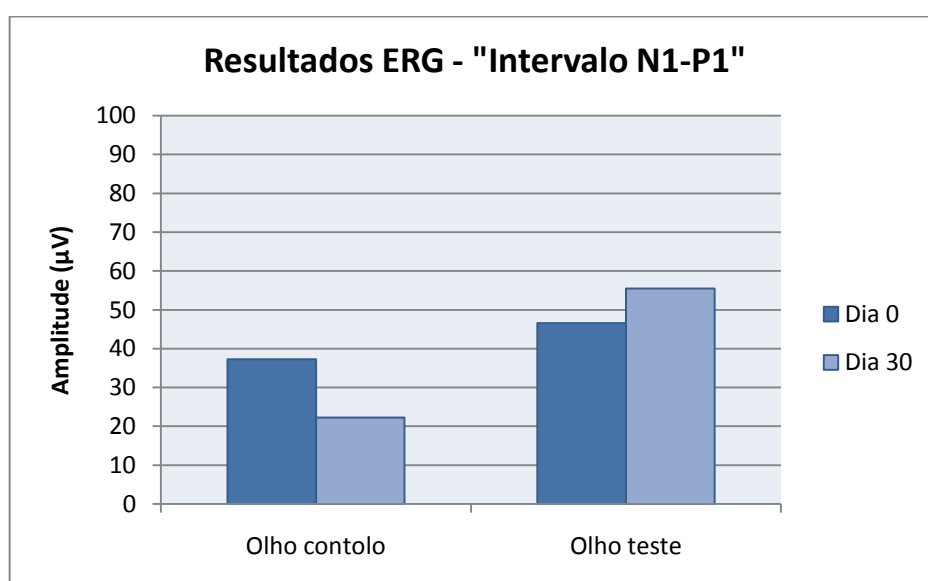
No gráfico nº12 representa-se esquematicamente os resultados obtidos no parâmetro “onda-b” em ambos os olhos, olho controlo e olho teste, no dia 0 e no dia 30 do estudo. Os olhos controlo registaram uma média de $47,86 \pm 8,6 \mu\text{V}$ no dia 0 e $37,57 \pm 15,7 \mu\text{V}$ no dia 30, enquanto que os olhos teste registaram uma média de $46,60 \pm 7,4 \mu\text{V}$ no dia 0 e $94,97 \pm 13,4 \mu\text{V}$ no dia 30. No gráfico nº 12 pode claramente observar-se o aumento significativo atrás mencionado.

Gráfico nº 12 – Resultados do ERG referentes à onda-b no início (dia 0) e no final do estudo (dia 30), nos olhos controlo e nos olhos teste.



Por último, o gráfico nº 13 é uma representação dos resultados obtidos no ERG referentes ao intervalo N1-P1 no início (dia 0) e no final do estudo (dia 30), nos olhos controlo e nos olhos teste. No que respeita aos resultados referentes ao intervalo N1-P1, os olhos controlo registaram uma média de $38,29 \pm 8,1 \mu\text{V}$ no dia 0 e $21,62 \pm 11,4 \mu\text{V}$ no dia 30 e os olhos teste registaram uma média de $46,60 \pm 4,5 \mu\text{V}$ no dia 0 e $55,48 \pm 10,5 \mu\text{V}$ no dia 30, não se traduzindo em alterações consideradas significativas.

Gráfico nº 13 – Resultados do ERG referentes ao intervalo N1-P1 no início (dia 0) e no final do estudo (dia 30), nos olhos controlo e nos olhos teste.



5. DISCUSSÃO

Para além do seu conhecido efeito eritropoiético, os estudos recentes demonstraram que tanto a EPO como os seus receptores (EPOR) estão presentes no sistema nervoso e o seu efeito neurotrófico e neuroprotector já foi demonstrado tanto em culturas de células como em vários modelos de doenças animais. O mecanismo exacto pelo qual a EPO e os EPOR conferem neuroprotecção em doenças degenerativas da retina ainda não está completamente esclarecido. As hipóteses actuais incluem a diminuição dos processos oxidativos e dos níveis de glutamato ao nível da retina, a reversão do vasoespasm, diminuição da apoptose, a modulação da inflamação e o recrutamento de “stem cells”.

Os estudos até agora realizados utilizaram as vias sistémicas, intravítrea e, mais recentemente, a retrobulbar, para administração ocular de EPO visando atingir o segmento posterior do globo ocular, todas elas não isentas de efeitos secundários. Com este trabalho pretendeu-se estudar uma via alternativa que fosse segura, eficaz, isenta de efeitos secundários e de fácil execução na prática clínica. Para tal, avaliámos a penetração ocular da EPO administrada pela via subconjuntival e os seus potenciais efeitos secundários, tanto ao nível do hemograma como do traçado de ERG.

5.1. Absorção vítrea

Em todos os animais envolvidos no estudo, a concentração basal de EPO no humor vítreo não foi mensurável pela metodologia analítica utilizada. Assumimos neste trabalho que uma vez que o corpo vítreo é avascular e se localiza na zona mais interna do globo ocular, que uma substância que o atinge em determinada concentração, estará na mesma concentração ou superior na retina e vascularização coroideia que o envolve.

Assim, e no que respeita à concentração vítrea, verificou-se que em todos os animais incluídos no estudo houve uma curva de absorção da EPO administrada pela via subconjuntival e que atingiu um valor máximo de $0,6 \pm 0,06$ mUI/ml às 12 horas após injeção, ficando claro que esta via permite a penetração de EPO até à retina. Este resultado sugere que a EPO é capaz de atravessar as barreiras hemato-oculares já antes mencionadas.

Mais estudos são necessários para avaliar a cinética vítrea da EPO administrada pela via subconjuntival, uma vez que 48 horas após a administração ainda era mensurável a presença de EPO no vítreo.

Os trabalhos até agora apresentados não são unânimes em relação à concentração terapêutica de EPO na retina. Um estudo realizado em culturas de células nervosas da retina concluiu que com uma concentração de 6 UI/ml de EPO se observava uma diminuição

da apoptose nas células expostas à toxicidade induzida pelo glutamato (Zhong et al., 2007). Outro estudo concluiu que quantidades de 5-10 UI de EPO administradas por via intravítrea protegiam as RCG e contribuíam para a regeneração parcial dos axónios após secção do nervo óptico (King et al., 2007). Mais recentemente, Zhang (2008) e os seus colaboradores definiram 0,6 UI/olho como a dose terapêutica para a retina do coelho com retinopatia diabética e 8-32 mUI/olho como a dose terapêutica da mesma doença em ratos.

No nosso trabalho obtivemos uma concentração de EPO no vítreo que atingiu um valor máximo de 0,6 mUI / ml. Considerando o volume do globo ocular do coelho, a concentração máxima por nós atingida por olho corresponde a um valor aproximadamente 600 vezes inferior ao proposto por Zhang et al. (2008).

Torna-se então imperativo a realização de mais estudos para avaliar as curvas de absorção/excreção com diferentes concentrações de EPO com o objectivo de definir qual a cinética de absorção desta molécula quando administrada pela via subconjuntival.

Em todos os olhos envolvidos no estudo observou-se, como consequência das punções vítreas, uma congestão conjuntival marcada, quemose e panuveíte com consequente diminuição da PIO. Quinze dias após as intervenções todos os olhos estavam visuais, sem sinais de inflamação e dois olhos apresentavam catarata capsular posterior como sequela. As observações decorrentes dos exames oftálmicos reforçam a ideia de que as punções vítreas são procedimentos invasivos, que acarretam riscos significativos para a integridade do globo ocular, podendo ocorrer complicações como cataratas, uveítes, endoftalmítes e consequente diminuição da visão.

5.2. Absorção sistémica e efeitos no hemograma

Considerando a absorção sistémica da EPO administrada pela via subconjuntival, constatou-se que em todos os animais incluídos no estudo houve efectivamente absorção, atingindo-se uma concentração máxima 3 horas após injeção com um valor de $33,4 \pm 0,66$ mUI/ml. A concentração basal média de EPO no soro dos indivíduos em estudo, determinada antes da administração subconjuntival, foi de $0,6 \pm 0,28$ mUI/ml. Este aumento fugaz da concentração sanguínea de EPO não se traduziu, no nosso ensaio, num aumento nem do hematócrito nem da contagem de eritrócitos, tanto aos 7 como aos 14 dias após administração.

Sendo assim a administração subconjuntival de EPO não desencadeou efeitos secundários indesejáveis ao nível do hematócrito. No caso da administração exógena de EPO por via sistémica ocorre aumento do hematócrito e consequente aumento da viscosidade sanguínea o que favorece a ocorrência de tromboembolismos nos pacientes humanos com diabetes e hipercolesterolemia.

A absorção vítrea da EPO administrada por via subconjuntival atingiu o seu valor mais elevado 9 horas após o pico da concentração sistémica. No nosso entender, este desfase temporal indica que provavelmente a grande parte da EPO administrada pela via subconjuntival penetra no globo ocular através de difusão e da circulação local, não sendo a circulação sistémica a principal responsável pela distribuição de EPO na retina.

5.3. Efeitos no ERG

As grandes surpresas deste estudo prendem-se com os resultados obtidos nos registos de ERG. O objectivo inicial da realização de ERG neste trabalho visava avaliar eventuais efeitos secundários adversos sobre a funcionalidade da retina, resultantes da administração subconjuntival da EPO. Contudo, e ao contrário do esperado, não se observaram diminuições nas respostas electrofisiológicas. Antes pelo contrário, observou-se um efeito benéfico que se traduziu num aumento de 49% na resposta da onda-b, que corresponde à despolarização das células bipolares e de Muller (células nervosas das camadas centrais da retina), em animais sem doença ocular e em condições fisiológicas. Em teoria, estes animais teriam uma resposta de ERG máxima, mas isso não se verificou e através da administração subconjuntival de EPO foi possível aumentar a resposta fisiológica basal. Uma das hipóteses possíveis para explicar este fenómeno prende-se com um eventual mecanismo de “turn on” / “turn off” destas células nervosas. Hoje sabe-se que, por exemplo os gatos, ao contrário dos cães, possuem 3 tipos de fotorreceptores que captam diferentes comprimentos de onda, o que lhes daria, em teoria, uma visão colorida semelhante à do homem. No entanto estes animais, apesar da sua capacidade potencial para ver 3 tipos de cores só vêem, tal como os cães, duas (Gelatt, 2007). Para este facto ainda não se encontrou uma justificação científica, mas um mecanismo de “turn off” destas células pode estar na base deste fenómeno. Outra hipótese, no nosso entender menos provável, seria a inibição dos mecanismos fisiológicos de apoptose que ocorrem em todas as células do organismo, incluindo a retina, e que ao fim de 30 dias se traduziria num aumento do registo de ERG. Parece-nos, no entanto, que este fenómeno por si só não justificaria um aumento de quase 50% no valor do parâmetro.

Para além disso, este achado científico não foi verificado em nenhum dos estudos anteriormente realizados. Todos os trabalhos publicados utilizaram outras vias de administração de EPO para a retina, que apesar de mais invasivas, garantiram uma concentração bastante superior à observada neste estudo. Em qualquer um dos estudos realizados anteriormente este efeito no ERG não foi observado, apesar de ficar demonstrado o efeito anti-apoptótico da EPO. Isto sugere, mais uma vez, que não deve ser o mecanismo de anti-apoptose o responsável por este aumento.

A ocorrência de alterações na circulação / oxigenação da retina é outra hipótese a ser considerada, mas mais estudos são necessários para avaliar quando é que se começa a verificar este aumento de resposta aos estímulos luminosos e durante quanto tempo ele perdura. A utilização de outros protocolos de estimulação de ERG poderá ser útil para esclarecer estes aumentos.

Como se justifica então que uma concentração vítrea aparentemente mais baixa do que seria desejável (de 0,6 mUI / ml) tenha tido uma resposta tão estimulante para as células da retina?

Pensamos que a concentração mensurável no vítreo não representa de forma fiel a concentração de EPO nas diversas camadas da retina que o envolvem que, no nosso entender, será superior e estará na origem de uma resposta tão positiva no ERG. Outros estudos, por exemplo com EPO rádio-marcada, são necessários para perceber em que camadas da retina a EPO se distribui em maior concentração e que percentagem da mesma atinge o humor vítreo. Outro aspecto a ter em conta é o elevado metabolismo da retina, assim como o elevado fluxo de circulação coróideia. Este facto provoca uma rápida “clearance” das proteínas nesta região. Um estudo recente indica que após a administração sub-retiniana de 10 UI de EPO a sua concentração diminui 1000 vezes em 24 horas, facto que não impediu o seu efeito neuroprotector sobre fotorreceptores da retina nesse mesmo estudo (Rex, Wong, Kodali & Merry, 2009).

No nosso entender, as perspectivas futuras prendem-se com estudos que avaliem a penetração ocular de EPO administrada pela via subconjuntival, formulada com recurso a novos excipientes de libertação prolongada, aumentando assim o tempo de permanência desta substância no local de administração.

Este trabalho reforça a ideia de que o nosso conhecimento sobre o sistema nervoso e mais especificamente sobre a retina é ainda limitado e que muito caminho há ainda a percorrer nesta maravilhosa área da “visão”.

6. CONCLUSÃO

Apesar das 100 UI de EPO administradas pela via subconjuntival conduzirem a um pico de concentração sistémica de EPO, este facto não se traduziu num aumento do hematócrito nem da contagem de eritrócitos. A dose administrada pela via subconjuntival neste estudo permitiu uma baixa absorção vítrea que, ao contrário do esperado, permitiu um aumento significativo na onda-b do ERG em condições fisiológicas.

Com este trabalho concluímos que a via subconjuntival é uma alternativa segura e bem tolerada pelo paciente, revelando-se uma alternativa promissora para a administração ocular de EPO. No entanto, mais estudos são necessários para definir a cinética vítrea e plasmática da EPO administrada por esta via e os seus efeitos no ERG, com o objectivo de atingir uma concentração terapêutica ao nível da retina, nos casos doenças isquémicas retinianas.

BIBLIOGRAFIA

- Arjamaa, O. & Nikinmaa, M. (2006). Oxygen-dependent diseases in retina: Role of hypoxia-inducible factors. *Experimental Eye Research*, 83, 473-483.
- Barnett, K. (2006). *Diagnostic Atlas of Veterinary Ophthalmology*. (2nd ed). Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Bocker-Meffert, S., Rosenstiel, P., Rohl, C., Warneke, N., Held-Feindt, J., Sievers, J. & Lucius, R. (2002). Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 2021-2026.
- Burkitt, G., Young, B. & Heath, J.W. (1994). *Wheater Histologia Funcional*. (3^a edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Chen, J., Connor, K.M., Aderman, C.M. & Smith, L.E. (2008). Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, Feb;118(2), 526-33.
- Chung, H., Lee, H., Lamoke, F., Hrushesky, W.J., Wood, P.A. & Jahng, W.J. (2009). Neuroprotective role of erythropoietin by antiapoptosis in the retina. *Journal of Neuroscience Research*, Aug 1,87(10), 2365-74.
- Del Amo, E.M. & Urtti, A. (2008). Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. *Drug Discov Today*, Feb;13(3-4),135-43.
- Duong, T.Q., Pardue, M.T., Thulé, P.M., Olson, D.E., Cheng, H., Nair, G., Li, Y., Kim, M., Zhang, X. & Shen, Q. (2008). Layer-specific anatomical, physiological and functional MRI of the retina. *NMR Biomed.*, November ; 21(9), 978-996.
- Fisher, J.W., (2003). Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. *Experimental Biology and Medicine*, January 1, 228(1), 1-14.
- Furrer, E., Berdugo, M., Stella, C., Behar-Cohen, F., Gurny, R., Feige, U., Lichtlen, P.D. & Urech, D.M. (2008). Pharmacokinetics and posterior segment biodistribution of ESBA105, an anti-TNF- α single-chain antibody, upon topical administration to the rabbit eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Aug 29.
- Gaudana, R., Jwala, J., Boddu, S. H. & Mitra, A. K. (2008). Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, Aug, 29.
- Gelatt, K.N. (2007). *Veterinary Ophthalmology*. (4th ed). Oxford: Blackwell Publishing.
- Geroski, D.H. & Edelhauser H.F. (2000). Drug delivery for posterior segment eye disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*,41(5), 961-4.

- Getty, R. (1986) *Sisson/Grossman Anatomia dos Animais Domésticos*. (5ª edição). (pp. 657-672). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
- Gilger, B.C. (2005). *Equine Ophthalmology*. Missouri: Elsevier Saunders.
- Grimm, C., Wenzel, A., Groszer, M., Mayser, H., Seeliger, M., Samardzija, M., Bauer, C., Gassmann, M. & Remé, C.E. (2002). HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nature Medicine*, 8, 718-724.
- Grivicich, I., Regner, A. & Rocha, A. (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 335-343.
- Guo, L., Moss, S.E., Alexander R.A., Ali R.R., Fitzke F.W. & Cordeiro M.F. (2005). Retinal Ganglion Cell Apoptosis in Glaucoma Is Related to Intraocular Pressure and IOP-Induced Effects on Extracellular Matrix. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, January, 46, No. 1, 175-182.
- Hwang, D., Tari, S., Wu, L., Chang, S., Forbes, M. & Tsai, J.C. (2006). Retinal function assessment following intravitreal injection of erythropoietin in rats: A dose-toxicity study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47:E-Abstract 5724.
- Jelkmann, W. (2004). Molecular biology of erythropoietin. *Internal Medicine*, Aug 43(8), 649-59.
- Kilic, U., Kilic, E., Soliz, J., Bassetti, C.I., Gassmann, M. & Hermann, D.M. (2005). Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *FASEB J*, 19, 249–251.
- King, C.E., Rodger, J., Bartlett, C., Esmaili, T., Dunlop S.A. & Beazley, L.D. (2007). Erythropoietin is both neuroprotective and neuroregenerative following optic nerve transection. *Experimental Neurology*, May;205(1), 48-55.
- Loftsson, T., Sigurdsson, H.H., Konrádsdóttir, F., Gísladóttir, S., Jansook, P. & Stefánsson, E., (2008). Topical drug delivery to the posterior segment of the eye: anatomical and physiological considerations. *Pharmazie*, Mar;63(3), 171-9.
- Mannermaa, E., Vellonen K. & Urtti, A. (2006). Drug transport in corneal epithelium and blood–retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1136-1163.
- McPherson, R. J., Jull, S.E., (2008). Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int. J. Devl Neuroscience*, 26,103-111.
- Narfström, K., Ekesten, B., Rosolen, S.G., Spiess, B.M., Percicot, C.L. & Ofri. R. (2002). Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 105(2), 83-92.
- North Cincinnati Eye Care (2008). *Glaucoma*. Acedido em Out. 26, 2008. Disponível em: <http://www.northcincinnatiyecare.com/34801/34822.html> .

- Petersen-Jones, S. & Crispin, S. (2002). *BSVA Manual of Small Animal Ophthalmology*. (2nd ed.). Gloucester: British Small Animal Association.
- Portera-Cailliau, C., Sung, C. H., Nathans, J. & Adler, R. (1994). Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, February 1; 91(3), 974–978.
- Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M.E., Thibault, D.J. & Zack, D.J. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 774-786.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P. & Mariotti, S.P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, 82, 844-851.
- Rex, T, Wong, Y., Kodali, K. & Merry, S. (2009) Neuroprotection of photoreceptors by direct delivery of erythropoietin to the retina of the retinal degeneration slow mouse. *Experimental Eye Research*, Nov;89(5),735-40.
- Slatter, D. (2001). *Fundamentals of veterinary ophthalmology*. (3th ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company. (pp.241-293).
- Song, B.J., Cai, H., Tsai, J.C., Chang, S., Forbes, M., Del Priore, L.V. (2008). Intravitreal recombinant human erythropoietin: a safety study in rabbits. *Current Eye Research*, Sep;33(9), 750-60.
- Tsai, J.C. (2008). Safety of intravitreally administered recombinant erythropoietin (an AOS thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.*, 106, 459-72.
- Tsai, J.C., Song, B.J., Wu, L. & Forbes, M. (2007). Erythropoietin: a candidate neuroprotective agent in the treatment of glaucoma. *J Glaucoma*, Sep;16(6), 567-71.
- Tsai, J.C., Wu, L., Worgul, B., Forbes, M. & Cao J. (2005). Intravitreal administration of erythropoietin and preservation of retinal ganglion cells in an experimental rat model of glaucoma. *Current Eye Research*, 30, 1025-1031.
- Urtti, A. (2006). Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1131-1135.
- Wang, Z., Shen, L., Tu, L., Hu, D., Liu, G., Zhou, Z., Lin, Y., Chen, L. & Qu, J. (2009). Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 1032-1041.
- Wang, Z., Zhao, K., Song, Z., Shen, L. & Qu, J. (2009). Erythropoietin as a novel therapeutic agent for atrophic age-related macular degeneration. *Medical Hypotheses*, 72, 448-450.
- Weishaupt, J.H., Rohde, G., Polking, E., Siren, A.L., Ehrenreich, H. & Bahr, M. (2004). Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 1514-1522.

- Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M. & Remé, C.E. (2005) .Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*, Mar;24(2), 275-306.
- Yamasaki, M., Mishima, H.K., Yamashita, H., Kashiwagi, K., Murata, K., Minamoto, A. & Inaba, T. (2005). Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Research*, 1050, 15-26.
- Zhang, J., Wu, Y., Jin, Y., Ji, F., Sinclair, S.H., Luo, Y., Xu, G., Lu, L., Dai, W., Yanoff, M., Li, W., Xu, G.T. (2008). Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. . *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Feb;49(2), 732-42.
- Zhang, J., Wu, Y., Xu, J., Ye, W., Zhang, Y., Weng, H., Shi, W., Xu, G., Lu, L., Dai, W., Sinclair, S., Li, W. & Xu, G.T. (2008). Pharmacokinetic and toxicity study of intravitreal erythropoietin in rabbits. *Acta Pharmacol Sin*, Nov;29(11), 1383-1390.
- Zhong, L., Bradley, J., Schubert, W., Ahmed, E., Adamis, A.P., Shima, D.T., Robinson, G.S. & Ng, YS. (2007). Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(3), 1212-8.
- Zhong, Y., Liu, X.H., Cheng, Y. & Min YJ. (2008). Erythropoietin with retrobulbar administration protects retinal ganglion cells from acute elevated intraocular pressure in rats. *Journal of Ocular Pharmacology Therapeutics*, Oct;24(5), 453-9.
- Zhong, Y., Yao, H., Deng, L., Cheng, Y. & Zhou, X. (2007). Promotion of neurite outgrowth and protective effect of erythropoietin on the retinal neurons of rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, Dec;245(12), 1859-67.
- Zhu, B., Wang, W., Gu, Q., Xu, X. (2008). Erythropoietin protects retinal neurons and glial cells in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental Eye Research*, Feb;86(2), 375-82.

ANEXOS

Anexo I – Comunicação livre em painel, 2008.

Anexo II – Exemplo de folha de resultados do hemograma.

Anexo III – Exemplo de folha de resultados de ERG.



Doseamento de EPO no humor vítreo e plasma de coelho pelo método ELISA após administração por via subconjuntival e intravítrea - resultados preliminares



Resende A.P.¹, Delgado E.¹, São-Braz B.¹ & Souza-Ramalho P.²

CIISA, Departamento de Clínica, Faculdade de Medicina Veterinária - UTL, Alameda da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa¹; Lab. Genética, Centro de Metabolismo e Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa²

Introdução

Estudos recentes demonstram que a Eritropoietina (EPO), para além do seu conhecido efeito eritropoiético, tem acção neuroprotectora e neuroregenerativa sobre as células ganglionares da retina (CGR), sendo actualmente considerada um promissor agente terapêutico nas doenças isquémicas retinianas. A morte das CGR resulta numa progressiva perda de visão, ocorrendo tanto no glaucoma como noutras doenças oculares causadas por hipóxia e isquémia. Estudos prévios utilizaram a via de administração sistémica ou a via intravítrea para atingirem concentrações terapêuticas ao nível da retina, ambas pouco exequíveis na prática clínica. Pretende-se estudar outras vias de administração de EPO a nível ocular que demonstrem eficácia, sejam minimamente invasivas e que apresentem uma baixa taxa de complicações na prática clínica. Este trabalho é um estudo preliminar que tem por objectivo avaliar a eficácia da via subconjuntival para administração de EPO ocular.

Materiais e Métodos

Foram utilizados dois Coelho albinos Nova Zelândia, origem Harlan, mantidos no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Foi realizado um exame oftalmológico completo em ambos os olhos dos coelhos antes e após a administração de EPO (NeoRecormon 5000®; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) e monitorizou-se a evolução de eventuais complicações durante 15 dias. Os procedimentos (punções vitreas, administração intravítrea e subconjuntival) foram realizados sob anestesia geral, induzida com propofol (Propofol Lipuro®, B Braun Medical Lda., Barcelona, Espanha) 2-8 mg / Kg EV) e mantida com isoflurano (Isoflor®, Sanofi veterinária, Barcarena, Portugal). Pela via intra-vítrea (injeção caudal ao limbo esclero-corneano) foram administradas 50 µl de EPO diluídas em 100 µl solução salina 0,9% no coelho 1. Pela via sub-conjuntival foram administradas 100 µl de EPO diluídas em 100 µl solução salina 0,9% no coelho 2. Os olhos contra-laterais de cada animal serviram de controlo. A cada animal foram realizadas três colheitas de 100 µl de humor vítreo através de punção vítrea e cinco colheitas de 0,5 ml sangue (às 0, 1, 3, 24 e 48 horas). A EPO foi quantificada no vítreo e plasma dos animais, através de método ELISA (Roche).

Resultados

Após administração intravítrea (Foto 1), obteve-se uma concentração de EPO de 107,1 UI/ml em 100 µl de amostra de vítreo colhida 1 hora após administração. A absorção sistémica de EPO administrada por esta via foi muito baixa (gráfico 1). Após administração subconjuntival (Foto 2) obteve-se uma concentração de EPO de 0,2 UI / ml em 100 µl de amostra de vítreo colhida 1 hora após administração. A administração de EPO pela via subconjuntival permitiu uma absorção sistémica no coelho que atingiu a concentração máxima entre a 1 e as 24 horas. Ao fim de 48 horas a concentração plasmática de EPO já tinha retomado valores fisiológicos (Gráfico 2). Nos olhos controlo não foram determinadas concentrações mensuráveis de EPO.

Em todos os olhos envolvidos no estudo observou-se, como consequência da punção vítrea, uma congestão conjuntival marcada, que se resolveu com consequente diminuição da pressão intra ocular (Foto 3). Em dois dos olhos ocorreu a formação duma catarata capsular posterior (Foto 4). No olho em que foi administrada EPO por via subconjuntival observou-se a formação duma vesícula subconjuntival que originou lagofthalmia transitória. Os animais foram medicados com enrofloxacina SID (5 mg/Kg, 7 dias, SC); caprofenol SID (4 mg/Kg, 3 dias, SC) e pomada oftálmica de cloranfenicol e prednisolona (SID OS) 48 horas após a punção vítrea. Quinze dias após as intervenções todos os olhos estavam visuais, sem sinais de inflamação e dois olhos apresentavam catarata capsular posterior como secura.

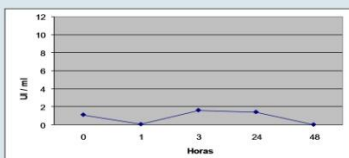


Gráfico 1 – Variação da concentração de EPO no plasma sanguíneo após administração intravítrea ao longo do tempo.



Foto 1 - Administração intra-vítrea no coelho anestesiado.



Foto 2 - Administração subconjuntival no coelho anestesiado.

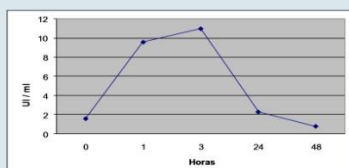


Gráfico 2 – Variação da concentração de EPO no plasma sanguíneo após administração subconjuntival ao longo do tempo.

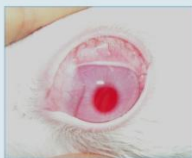


Foto 3 - Congestão conjuntival, queimadura, congestão da íris, 48 horas após as punções vitreas.

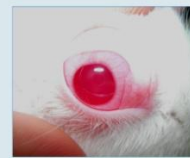


Foto 4 - Catarata capsular posterior inicial visível em miátria induzida, 48 horas após as punções vitreas.

Discussão

A via subconjuntival demonstrou ser uma via possível para administração de EPO. O volume de 100 µl administrado por esta via foi excessivo para o olho de coelho sendo recomendável a sua diminuição, de modo a evitar a situação de lagofthalmos transitória observada. O método ELISA (Roche) revelou-se eficaz para o doseamento da EPO no humor vítreo de coelho, para trabalhos subsequentes.

No entanto, mais estudos são necessários para determinar a cinética sanguínea e intravítrea da EPO após administração por esta via.

Financiamento: CIISA (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal)

Bibliografia

- Kirk U, Kilo E, Solz J, Bassetti CI, Sestoraro M, Hommano DM. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK1-2. *FASEB J*. 2008;18:248-251.
- King CR, Prigler J, Barlett E, Karnell T, Corrig SA, Beatty LD. Erythropoietin is both neuroprotective and neuroregenerative following optic nerve transection. *Exp Neurol*. 2007;197:148-62.
- Luhmann T, Eggenhofer HK, Krenscholtz F, Grottel S, Jansen O, Seldmann E. Topical drug delivery to the anterior segment of the eye: anatomical and pharmacological considerations. *Pharmazie*. 2008;63(3):171-9.
- Quigley HA, Nashelsky RK, Koenigs LA, Presser ME, Thibaut DL, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:1774-786.
- Tsai JC, Sheng M, Wu L. Erythropoietin is a candidate neuroprotective agent in the treatment of glaucoma. *J Glaucoma*. 2007;16(10):567-71.
- Tsai JC, Wu L, Morgan B, Forbes M, Cao J. Intravitreal administration of erythropoietin and preservation of retinal ganglion cells in an experimental rat model of glaucoma. *Curr Eye Res*. 2005;30:1025-1031.
- Winkler JA, Rühm G, Pöhlitz E, Sirois AL, Eisenbach H, Bahr M. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:1514-1522.
- Yamashita M, Matsuda HK, Yamashita N, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res*. 2005;1001:18-28.
- Zhang Y, Wu Y, Jin Y, Ji P, Switlow SP, Luo Y, Xu G, Lu L, Dai W, Yanoff M, Li W, Xu GT. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetic. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(2):732-42.
- Zhang L, Bentley J, Shalton W, Ahmed E, Adams AP, Shinn DT, Robinson GS, Ng YS. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(3):1212-8.
- Zhang Y, Yan H, Dong L, Cheng L, Zhou X. Protection of mouse retinopathy and protective effect of erythropoietin on the retinal neurons of rats. *Chin J Ophthalmol*. 2007;41(10):1658-67.
- Zhu B, Wang W, Gu X, X. Erythropoietin protects retinal neurons and glial cells in early-stage streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Eye Res*. 2008;86(2):378-82.

Santarém, Congresso SPCV, 2008



**LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROFESSOR M. BRAÇO FORTE
HEMOGRAMA**

ID: 202
Nº de Análise: 1801
Recebido em: 31-03-2009

Requisitado por: Profª Dr.ª Berta São Bráz

Nome do Proprietário: FMV

Morada:

Código Postal

Telefone: 0

Fax: 0

Espécie Leporídeo Nome do Animal: H 4.2 Sexo: Idade: 0

Raça: Material enviado: Sangue em E.D.T.A.

Nº de amostras 1 Data da colheita: 31-03-2009 Qualidade da amostra: Razoável

RESULTADOS

Unidades

Leucócitos:	3,04	$\times 10^3 / \mu\text{L}$
Eritrócitos:	5,85	$\times 10^6 / \mu\text{L}$
Plaquetas:	15,8	$\times 10^3 / \mu\text{L}$
Hemoglobina:	12,5	g/dl
Hematócrito	35,2	%
VCM:	60,3	fl
HCM:	21,4	pg
CHCM:	35,5	g/dl

%

Valores Absolutos

Neutrófilos não segmentados:	0	0	/ μL
Neutrófilos segmentados:	68	2067	/ μL
Linfócitos:	28	851	/ μL
Monócitos:	4	122	/ μL
Eosinófilos:	0	0	/ μL
Basófilos:	0	0	/ μL

Observações:

Sem agregação plaquetária.

Sérgio Pereira

O Responsável

Av. da Universidade Técnica - 1300 477 Lisboa - Tel. 21 365 28 00 - Ext. 1324 - Fax. 21 365 28 97

ANEXO III

RETIport32

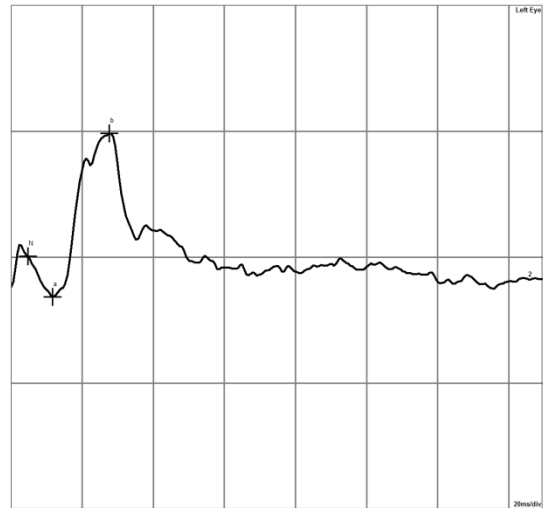
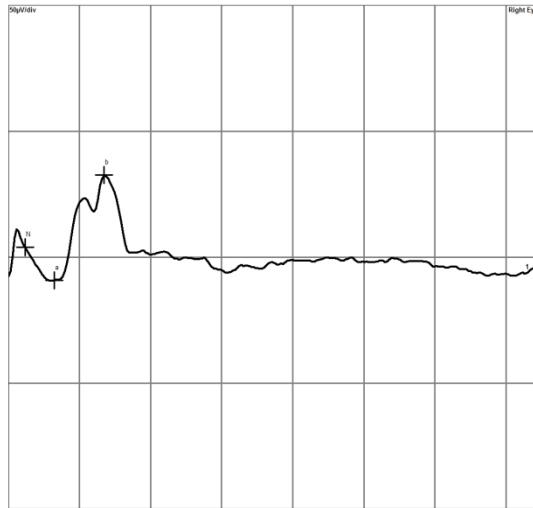
Hospital / Pratices Name
Address

Patient: **Coelho 5_01-12-2008**
 Tested: 30-03-2009 11:34:03
 ID:

Sex/Age: M/0
 Operator:

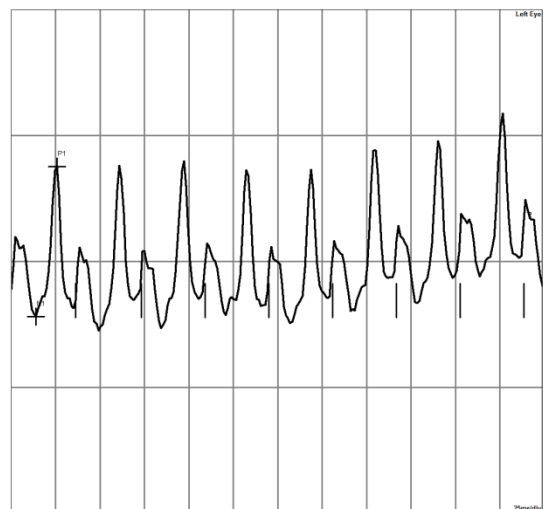
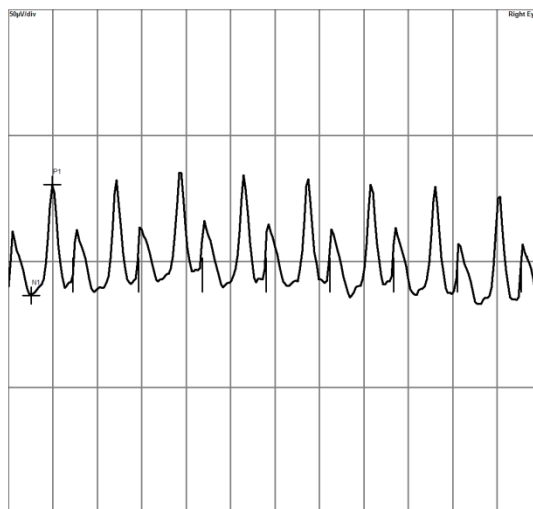
Electrode: DTL Thread
 Pupil Size: nondil.
 Breed:

pkERG



Channel	a [ms]	b [ms]	a-wave	b-wave
1 R-C1 0dB	13	27	13 μ V	41,9 μ V
2 L-C1 0dB	12	28	16 μ V	65 μ V

28Hz



Channel	N1 [ms]	P1 [ms]	N1-P1	28Hz Ampl.
1 R-C1 0dB	13	25	43,9 μ V	7,22 μ V
2 L-C1 0dB	14	26	59,5 μ V	12,1 μ V