



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

CONRADO ROBERTO HOFFMANN FILHO

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE ESCLERA E
CORÓIDE DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS COM
CANDESARTAN**

CURITIBA

2012

CONRADO ROBERTO HOFFMANN FILHO

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE ESCLERA E
CORÓIDE DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS COM
CANDESARTAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim
Précoma

Co-orientador: Rogil José de Almeida
Torres

CURITIBA

2012

CONRADO ROBERTO HOFFMANN FILHO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 95

Aos doze dias do mês de março de 2012, realizou-se a sessão de defesa de dissertação "AVALIAÇÃO HISTOMOFORMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA ESCLEROCOROIDEANA EM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS COM CANDESARTAN" Área de Concentração: Lesão Celular, Reparação e Cicatrização, apresentada por **Conrado Roberto Hoffmann Filho** sob orientação do **Prof. Dr. Dalton Bertolim Precoma**.

Requisito para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Flavio Daniel Saavedra Tomasich	
Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa	
Prof. Dr. Mario Sergio Julio Cerci	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Flavio Daniel Saavedra Tomasich

Avaliação: APROVADO

Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa

Avaliação: APROVADO

Prof. Dr. Mario Sergio Julio Cerci

Avaliação: M. S. Julio Cerci APROVADO

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

As imagens deverão ser anexadas e corrigidas para a foto final da Tese

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes

Isaac Newton

(1643 – 1727)

Aos meus pais (Conrado e Iara), pelo estímulo no caminho do saber. Por sua cobrança em me tornar melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor **Dalton Bertolim Précoma** meu orientador e amigo pelo grande apoio e pela confiança depositados na realização deste projeto.

Ao professor doutor **Rogil Jose de Almeida Torres** que permitiu utilizar sua linha de pesquisa em meu trabalho e forneceu-me todo apoio necessário para o desenvolvimento do mesmo.

À professora doutora **Márcia Olandoski** pela orientação e ensinamento dos princípios de bioestatística, que foram úteis para a análise do material coletado e por sua atenção na obtenção dos dados estatísticos.

À professora doutora **Lucia de Noronha** que foi fundamental na análise do material histológico.

À **equipe do laboratório** de Patologia da Pontifica Universidade Católica do Paraná, pela colaboração na realização deste projeto.

As alunas **Isabela de Carvalho Martins e Sarah Fagundes Grobe** do curso de medicina da Pontifica Universidade Católica do Paraná, pela grande colaboração.

À meus filhos **Ian, Yasmin e Thaína** pela paciência e entendimento na falta de minha presença e pelo seu amor incondicional.

Aos **professores** da Pontifica Universidade Católica do Paraná pela dedicação.

À **Pontifica Universidade Católica do Paraná** por fornecer toda infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste projeto.

À minha secretária **Drieli Aparecida da Silva Meerholz** pela sua grande ajuda na organização e estruturação deste trabalho e pela sua paciência nas inúmeras trocas de agenda que teve que fazer.

À equipe do Hospital Angelina Caron pelo apoio incondicional e pelo seu suporte na realização dos procedimentos cirúrgicos.

OBRIGADO.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II	Angiotensina II
Ang1	Angiopoetina 1
Ang 2	Angiopoetina 2
ANOVA	Análise de variância
Apo B	Apolipoproteína B
ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia
AT1-R	Receptores de angiotensina II tipo 1
AT2-R	Receptores de angiotensina II tipo 2
AVC	Acidente vascular cerebral
BRA	Bloqueador do receptor da angiotensina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DM	Diabetes Mellitus
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ELISA	Enzyme-linked immuno absorbent assay
EPR	Epitélio pigmentário da retina
FDA	Food and Drug Administration
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LSD	Método de diferença mínima significativa
MB	Membrana de Bruch
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MMP	Matriz metaloproteinase
NF-kB	Fator de atividade de transcrição
NO	Óxido Nítrico

NOS	Óxido Nítrico Sintase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PUC	Pontifícia Universidade Católica
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SRA	Sistema renina angiotensina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Moléculas de adesão de células vasculares
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR-1	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 1
VEGFR-2	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 2

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e siglas	XVII
Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XII
Anexos	XIII
Resumo	XIV
Abstract	XV
1- INTRODUÇÃO	1
2-OBJETIVOS	4
3- REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 FATORES MODIFICÁVEIS DA DMRI	5
3.1.1 DMRI Hipercolesterolêmica	5
3.1.2 DMRI Aterosclerose	8
3.2 COROÍDE E RETINA	11
3.3 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	13
3.4 VEGF E VEGFR-1	14
3.5 VEGF E RETINOPATIA	16
3.6 BLOQUEADORES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	17
3.7 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA, ATEROSCLEROSE E INFLAMAÇÃO	18
4 MATERIAIS E METODOS	20
4.1 AMBIENTE EXPERIMENTAL	20
4.2 ANIMAIS	20
4.3 DIETA	21
4.4 PREPARO DA RAÇÃO SUPLEMENTAR	22
4.5 CANDESARTAN	23
4.6 CONTROLE DE PESO E LABORATORIAIS	23
4.6.1 Peso	24

4.6.2 Glicemia	24
4.6.3 Lipídeos	24
4.6.4 Análise de Esclera e Coróide	24
4.7 NORMAS ADOTADAS	25
4.8 PROCEDIMENTOS	25
4.8.1 Anestesia	25
4.8.2 Coleta de Amostras de Sangue	26
4.8.3 Enucleação dos Globos Oculares	26
4.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICAS	27
4.9.1 Preparo das Amostras	27
4.9.2 Análise Histológica	27
4.9.3 Análise histomorfométrica Quantitativa de Esclera e Coróide	28
4.9.4 Análise Imunohistoquímica da Esclera e Coróide	29
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS	31
5.1 PESO, COLESTEROL, GLICEMIA, HDL E TRIGLICÉRIDES	31
5.2 ESCLEROSE E CORÓIDE	37
5.3 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL	41
6 DISCUSSÃO	44
6.1 MODELO UTILIZADO	44
6.2 PESO E VARIÁVEIS LABORATORIAS	45
6.3 FISIOPATOGENIA DA DMRI E O MODELO UTILIZADO	47
6.4 VEGF	49
6.5 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E O MODELO UTILIZADO	50
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
NORMAS ADOTADAS	63

LISTA DE IMAGENS

Imagens

Imagem 1 – Processo Inflamatório.....	06
Imagem 2 – Drusas	07
Imagem 3 – DMRI Úmida	10
Imagem 4 - Camadas	12
Imagem 5 –Olho Normal	12
Imagem 6 – Atrofia Geográfica	13
Imagem 7 – Imagem da família VEGF e seus receptores	16
Imagem 8 – Estrutura molecular do candesartan.....	18
Imagem 9 - Demonstrativo do delineamento experimental.....	22
Imagem 10 - Administração do candesartan por gavagem oral	23
Imagem 11 – Demonstrativo de análise de esclera e coróide (coróide linha azul e esclera seta branca)	25
Imagem 12 - Retirada dos globos oculares.....	26
Imagem 13 - Sistema para aquisição das imagens.....	28
Imagem 14 – Comparação da média de peso dos coelhos no início do experimento e na eutanásia	33
Imagem 15 - Relação de Colesterol inicial e final	35
Imagem 16 - Relação de HDL no momento inicial e final.....	35
Imagem 17 – Relação de triglicerídeos no momento inicial e final.....	36
Imagem 18 – Relação média de coróide entre os grupos (dados em micrometros).....	38
Imagem 19 – Relação média de Esclera entre os grupos (dados em micrometros)	39
Imagem 20 – Fotomicrografia de coelho não hipercolesterolêmico que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE).Observe que há raros histiócitos (seta vermelha) nestes animais.....	40
Imagem 21 - Fotomicrografia de coelho hipercolesterolêmico que	

demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera.....	40
Imagem 22 - Fotomicrografia de coelho hipercolesterolêmico tratado com candesartan que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera, os quais são menos numerosos que os coelhos hipercolesterolêmicos.....	41
Imagem 23 – Relação de VEGFR-1 entre os três grupos (em micrometros quadrados)	42
Imagem 24 - Fotomicrografia da região esclerocoroidal de animal do G1 demonstrando mínimas áreas de imunopositividade para o anti-VEGFR-1	42
Imagem 25- Fotomicrografia da região esclerocoroidal de animal do G2 demonstrando áreas de imunopositividade para o anti-VEGFR-1	43
Imagem 26 - Fotomicrografia da região esclerocoroidal de animal do G3 demonstrando áreas de imunopositividade para o anti-VGEFR-1	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Demonstrativo dos grupos e dieta.....	21
Tabela 2 – Peso (em gramas) e variáveis laboratoriais (em miligramas por decilitros) no momento basal	32
Tabela 3 – Diferença de peso nos grupos no momento basal	32
Tabela 4 - Peso (em gramas) e variáveis laboratoriais (em miligramas por decilitros) no momento eutanásia.....	34
Tabela 5 – Diferença de colesterol total e HDL entre os grupos no 42 dia.....	36
Tabela 6 – Morfometria de esclera e coroide.....	37
Tabela 7 – Imunohistoquímica para VEGFR-1 (esclera e coroide em micrometros).....	41

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer de Protocolo de Pesquisa	64
--	----

RESUMO

INTRODUÇÃO: a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença ocular degenerativa. Alguns dos fatores causais desta doença são compartilhados pela doença aterosclerótica, sendo a origem de ambas relacionadas às alterações inflamatórias. **OBJETIVO:** avaliar, por meio de técnicas histomorfométricas e imunohistoquímicas a eficácia do candesartan na prevenção de alterações degenerativas na esclera e coróide de coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. **MÉTODOS:** foram estudados 34 coelhos *new zealand*, divididos em três grupos: grupo dieta normal (G1), grupo dieta hipercolesterolêmica a 1% (G2) e grupo dieta hipercolesterolêmica a 1% acrescida de candesartan (G3). Os coelhos foram pesados e submetidos à dosagem sérica de colesterol total (CT), colesterol de alta densidade (HDL), triglicerídeos e glicemia de jejum. Estes dados foram coletados no início do experimento e no 42^o dia (eutanásia). A esclera e a coróide foram submetidas à análise histomorfométrica com hematoxilina-eosina e também à análise imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-VEGF, sendo analisadas pelo exame de morfometria de cores. **RESULTADOS:** em relação ao peso não houve diferença estatística entre os grupos no 42^o dia. Houve diferença estatística no CT do G1 em relação ao G2 ($p < 0,001$), do G1 em relação ao G3 ($p < 0,001$) e do G3 em relação ao G2 ($p < 0,001$). Não houve diferença nas variáveis triglicerídeos e glicemia de jejum. Na análise histomorfométrica da esclera do G1 não houve diferença entre o início e o final do estudo, já na esclera do G2 houve diferença do G1 ($p = 0,008$) e do G3 ($p = 0,032$), sem diferença entre G1 e G3 ($p = 0,472$). A coróide nos três grupos não apresentou diferença. A análise imunohistoquímica da esclera e coróide com o anti VEGFR-1 demonstrou diferença entre o G1 e G2 ($p < 0,001$) e entre G1 e G3 ($p = 0,001$), não se obteve diferença entre G2 e G3 ($p = 0,377$). **CONCLUSÃO:** no modelo utilizado, os achados permitem concluir que a dieta hipercolesterolêmica provoca alterações degenerativas em escleras de coelhos. A utilização de candesartan resultou em atenuação do espessamento das escleras, entretanto, não foi efetiva em prevenir a infiltração de macrófagos e histiócitos assim como o acúmulo de VEGF.

Descritores: Aterosclerose. Degeneração macular relacionada à idade. Colesterol. Esclera e coróide . Candesartan.

ABSTRACT

INTRODUCTION: age-related macular degeneration (AMD) is a degenerative eye disease. Some of the causal factors of this disease are common to atherosclerotic diseases and the origin of both diseases is related to inflammatory changes. **OBJECTIVE:** To evaluate by histomorphometric and immunohistochemical techniques, the efficacy of candesartan in preventing degenerative changes in sclera and choroid of rabbits submitted to hypercholesterolemic diet. **METHODS:** Studies were conducted on 34 New Zealand rabbits divided into three groups: (G1) the normal diet group, (G2) the hypercholesterolemic 1% diet group, and (G3) the hypercholesterolemic 1% plus candesartan diet group. The rabbits were weighed and subjected to a total serum cholesterol (TC), high-density cholesterol (HDL), triglycerides and fasting glucose. This data was collected at baseline and on the 42nd day (euthanasia). The sclera and choroid were subjected to histomorphometric analysis with hematoxylin-eosin and also to immunohistochemical analysis with the monoclonal anti-VEGF antibody and were analyzed by the color morphometric exam. **RESULTS:** There was no statistical difference in weight between the groups on the 42nd day. There was a statistical difference in the TC of G1 compared to G2 ($p < 0.001$), of G1 compared to G3 ($p < 0.001$) and of G3 compared to G2 ($p < 0.001$). There was no difference in the triglycerides variables and fasting glucose. In the histomorphometric analysis of the sclera of G1, there was no difference from the beginning to the end of the study. However, the sclera of G2 was different to that of G1 ($p 0.008$) and that of G3 ($p 0.032$) with no difference between G1 and G3 ($p 0.472$). The choroid in the three groups showed no difference. The immunohistochemical analysis of the sclera and choroid with anti VEGFR-1 showed a difference between G1 and G2 ($p < 0.001$) and between G1 and G3 ($p 0.001$), with no difference between G2 and G3 ($p 0.377$). **CONCLUSION:** in the model used, the findings showed that the hypercholesterolemic diet causes histomorphometric and immunohistochemical abnormalities of the sclera and that the use of candesartan was effective in attenuating changes in the thickness of the sclera, but was not effective in reducing the immunohistochemical changes triggered.

Keys words: Atherosclerosis. Age related macular degeneration. Cholesterol. Sclera and choroid . Candesartan.

1 INTRODUÇÃO

Degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) é uma doença degenerativa que afeta a mácula, região central da retina que é responsável pela acuidade visual e visão de cores. É a causa mais importante da perda de visão entre pessoas idosas nos países industrializados⁽¹⁾. Existe cerca de 8 milhões de pessoas nos Estados Unidos em idade superior a 55 anos com achados de DMRI leve ou moderada que estão sob alto risco de desenvolver perda visual moderada, e aproximadamente um milhão desenvolverá DMRI avançada no decorrer dos 5 anos seguintes⁽²⁾. No censo americano de 2000, a DMRI foi a principal causa de cegueira entre brancos atingindo a cifra de 54,4% dos casos⁽³⁾. Diagnósticos da DMRI tardia aumentam consideravelmente com a idade, afetando uma em cada 10 pessoas brancas com mais de 80 anos⁽⁴⁾.

A DMRI é a terceira causa de cegueira irreversível, e espera-se que o ônus da mesma para o indivíduo e para a sociedade aumentem como resultado do aumento da expectativa de vida e redução de nascimentos, o que resulta numa população mais velha. No entanto, dados publicados recentemente em estudo populacional transversal mostrou que entre os anos de 2005 a 2008 a prevalência de qualquer caso de DMRI foi de 6,5%, e de DMRI tardia de 0,8%, que foi menor que a prevalência desta entidade entre os anos de 1988 a 1994, que chegou ao nível de 9.4% em pessoas acima dos 40 anos⁽⁵⁾.

Devido ao impacto sócio econômico associado à sua patogênese incerta e poucas terapias disponíveis para tratamento, muitos investigadores têm se debruçado em estudos para identificar fatores de risco para esta patologia

Os fatores de risco podem ser divididos em genéticos, ambientais, demográficos⁽⁶⁾, dietéticos, médicos, de estilo de vida e oculares^(1, 7). E podem ser classificados como modificáveis e não modificáveis. Dentre os não modificáveis estão idade, história familiar de DMRI, a coloração da íris e problemas de refração.

Os fatores nos quais podemos interferir são o tabagismo, índice de massa corporal, dieta, consumo de álcool, exposição cumulativa à luz solar e os fatores cardiovasculares^(4, 8, 9).

O acúmulo de lipídios neutros na membrana de Bruch (MB) é uma grande mudança na coróide e retina humanas e contribui para a formação das lesões extracelulares associadas com a DMRI^(10, 11).

Em modelo animal, a dieta hipercolesterolêmica leva à anormalidade do complexo esclero-coroideano, lesões nas células endoteliais de capilares retinianos, aumento de lipídios nas camadas externas da retina e alterações na MB^(11, 12).

Estudo realizado em ratos deficientes em receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), tratados com dieta rica em gorduras apresentou espessamento significativo da MB, achados histológicos similares às drusas da DMRI precoce, enquanto ratos controle, com receptores normais de LDL não tiveram anormalidades significativas da mesma⁽¹³⁾, sendo que no primeiro grupo os achados histológicos são semelhantes aos das drusas da DMRI precoce. Neste mesmo estudo nos ratos deficientes em receptores de LDL os autores demonstraram reatividade imunohistoquímica para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no epitélio pigmentado da retina (EPR), na camada plexiforme externa e nos segmentos fotorreceptores internos⁽¹³⁾.

Hipertensão arterial é um fator de risco conhecido para a aterosclerose, e sabe-se que ocorrem alterações no fluxo sanguíneo coroidal na presença de hipertensão. Entretanto um grande número de estudos populacionais falhou em demonstrar alguma associação significativa entre os estágios de DMRI e hipertensão^(8, 14).

A inflamação vascular é um processo complexo iniciado pela ativação do sistema imune levando à expressão aumentada de VEGF e da proteína de adesão intercelular de leucócitos (ICAM 1)⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Estudos pregressos demonstraram que a interleucina 6 (IL-6) divide características comuns com o VEGF, sendo que ambos são induzidos por hipóxia e ambos têm seu papel na inflamação e permeabilidade vasculares e na angiogênese patológica^(6, 18). A IL-6 induz expressão de VEGF em modelos de neovascularização coróideana. O bloqueio do receptor da IL-6 reduz a

expressão do VEGF em modelos de neovascularização corioideana laser induzida⁽¹⁹⁾.

O VEGF-A é a mais potente proteína angiogênica conhecida e sua expressão está anormalmente elevada em pacientes com DMRI e em modelos animais experimentais⁽¹⁸⁾.

A angiotensina (Ang) e componentes do sistema renina angiotensina (SRA) são expressos na retina⁽²⁰⁾. Existem evidências que indicam que a angiotensina II (Ang II) tem um papel fundamental na patogênese da doença vascular retiniana. Além de ser um potente agente vasopressor ela é um potente indutor de inflamação e crescimento vascular pela indução de integrinas, moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento e pró fibróticos⁽²¹⁾.

Na neovascularização corioideana o complexo EPR-coróide sofre influência do SRA. Foi realizado estudo com avaliação imunohistoquímica para componentes do SRA em modelos murinos e humanos de neovascularização corioideana, incluindo em DMRI, evidenciando positividade para receptores de angiotensina II tipo1 (AT1) e receptores de angiotensina II tipo 2 (AT2) e para angiopoetina 2 (Ang 2)⁽²²⁾. Além disso, o tratamento com um inibidor da ECA reduziu a expressão de moléculas inflamatórias em modelos de neovascularização corioideana⁽²³⁾.

2 OBJETIVOS

Avaliar, por meio de técnicas histomorfométricas e imunohistoquímicas, a eficácia do candesartan na prevenção de alterações degenerativas na esclera e coróide de coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FATORES MODIFICAVEIS DA DMRI

3.1.1 DMRI e Hipercolesterolemia

Em coelhos, a dieta rica em colesterol induz alterações de membrana basal e do complexo esclero-coroideano⁽²⁴⁾, bem como lesão em células endoteliais e aumento de lipídios nas camadas externas da retina causando isquemia crônica, contribuindo para o aumento do glutamato excitatório que atua nos receptores N-metil-D-aspartato localizados na membrana plasmática das células gliais e neuronais da retina⁽²⁵⁾. Hiperestimulação dos receptores glutametérgicos induz ao aumento do cálcio intracelular para níveis tóxicos induzindo à formação de óxido nítrico sintase (NOS) e liberação de óxido nítrico^(26, 27). O incremento na produção de NO é citotóxico e pode causar morte ou apoptose celular⁽²⁸⁾. O aumento excessivo do cálcio livre tem uma grande gama de efeitos deletérios incluindo a inibição da função mitocondrial, redução dos níveis celulares de ATP, evoluindo para a morte das células neuronais⁽²⁹⁾. Coelhos hipercolesterolêmicos, tem sido utilizado em pesquisas de aterosclerose nos últimos 60 anos trazendo pistas relevantes de como estas lesões se desenvolvem em humanos. Estudos experimentais têm mostrado que hipercolesterolemia aumenta a expressão de óxido nítrico sintase induzível (NOS-2) conduzindo à peroxidação lipídica e ao processo oxidativo de dano tecidual⁽³⁰⁾. Este ambiente pró oxidativo poderia facilitar a oxidação espontânea de colesterol em oxisteróis, que interfeririam com a gênese de atividades citotóxicas pró inflamatórias e pró angiogênicas responsáveis pelas lesões da DMRI⁽³¹⁾. A oxidação de LDL em 7-cetocolesterol nos depósitos lipídicos na coriocapilar e na MB fazem ocorrer a elevação do VEGF 8 a 10 vezes acima de controles em estudos em primatas⁽³²⁾. Estudo realizado em pacientes com colesterol elevado também demonstraram elevação do VEGF e que o tratamento da dislipidemia causou redução de valores do mesmo⁽³³⁾.

Partículas lipídicas acumulam na MB no local exato onde surgem as drusas. Esta observação leva à hipótese que estas partículas lipídicas contribuem para a formação de drusas e para o desenvolvimento da DMRI⁽³⁴⁾.

A DMRI é uma doença degenerativa que envolve o EPR, os fotorreceptores, a MB e a coriocapilar. A DMRI precoce ocorre pela deposição de determinadas substâncias entre a membrana basal do EPR e a MB^(35, 36).

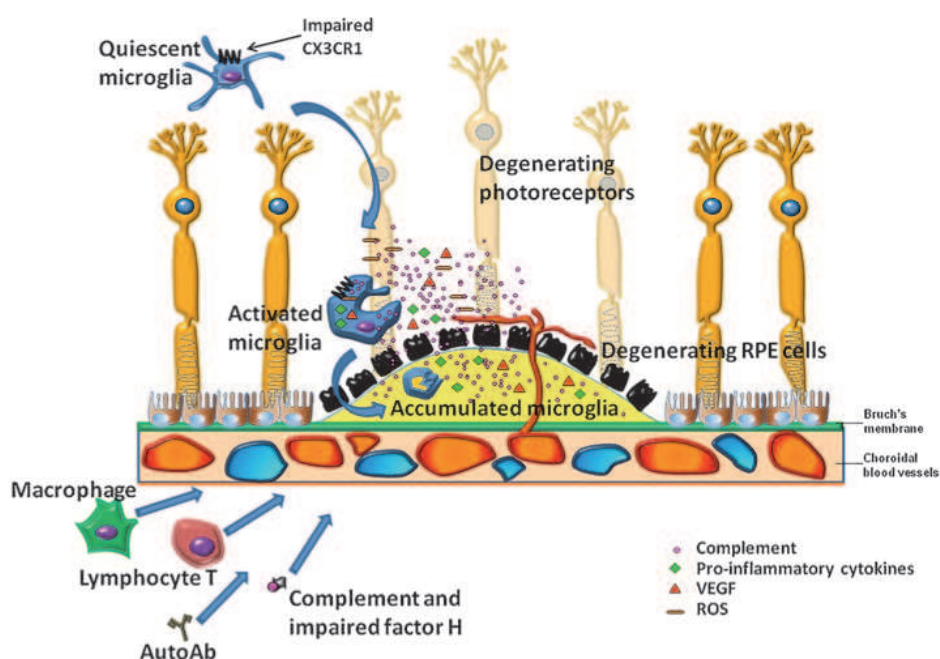


Imagem 1– Processo Inflamatório

Fonte: Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina
Elisa Buschini a,b,1,* , Antonio Piras a,1, Raffaele Nuzzi b, Alessandro Vercelli a
E. Buschini et al. / Progress in Neurobiology 95 (2011) 14–25

As drusas são depósitos extracelulares localizados entre o EPR e a MB, sendo estas uma das marcas registradas da DMRI. As drusas contêm lipídios, entre eles colesterol na forma esterificada e não esterificada⁽²⁷⁾. A origem desses depósitos é atribuída principalmente ao mau funcionamento das células do EPR. Essas células, após fagocitarem as extremidades dos fotorreceptores, enviam restos celulares maiores que o normal para a coriocapilar. Estes não ultrapassam a MB e depositam-se sobre ela. As drusas podem ser divididas em drusas duras, que são menores e

com bordos bem delimitados e drusas moles, maiores, de bordos imprecisos e as vezes confluentes, sendo estas as precursoras da DMRI⁽³⁷⁾.

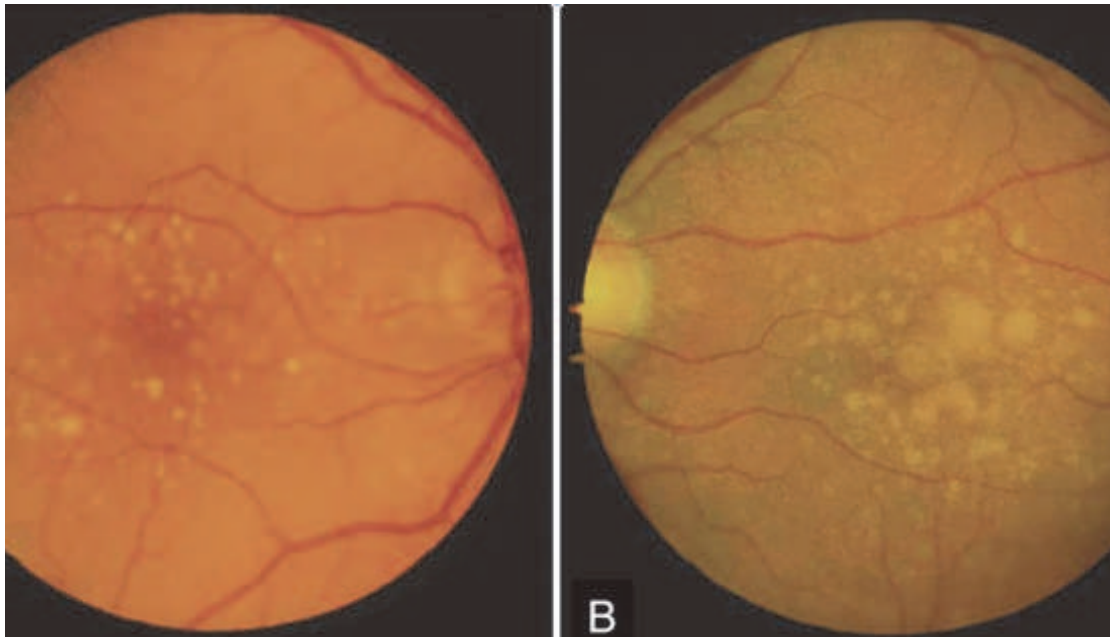


Imagem 2: Drusas

Fonte: An Integrated Hypothesis That Considers Drusen as Biomarkers of Immune-Mediated Processes at the RPE-Bruch's Membrane Interface in Aging and Age-Related Macular Degeneration. Gregory S. Hageman^{a,*}, Phil J. Luthert^b, N.H. Victor Chong^{a,b}, Lincoln V. Johnson^c, Don H. Anderson^c, Robert F. Mullins^a.

Hipercolesterolemia causa uma resposta inflamatória na micro vascularização que é acompanhada por uma expressão aumentada dos receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1-R) nas células endoteliais. O bloqueio de AT1-R atenua a resposta inflamatória à Ang II⁽³⁸⁾. Em estudo utilizando camundongos com deficiência de receptores de LDL foi demonstrado espessamento da MB com redução do número de fenestrações endoteliais, perda da estrutura regular e degeneração da mesma, apresentando, ainda elevação do VEGF na coriocapilar, correlacionando-se positivamente com a quantidade de acúmulo lipídico na MB⁽¹³⁾.

3.1.2 DMRI e Aterosclerose

Aterosclerose é um processo patológico complexo, crônico e progressivo. Existem múltiplos mecanismos potenciais contribuindo para a susceptibilidade à aterosclerose. Injúria do endotélio, proliferação de células musculares lisas, migração de monócitos e macrófagos, e a rede reguladora de fatores de crescimento e citocinas são importantes no desenvolvimento da aterosclerose. A dislipidemia, a hipertensão, o aumento de radicais livres pelo tabagismo e a diabetes causam inflamação crônica da parede vascular e uma resposta imune anormal. Sua formação é desencadeada pela ativação de células endoteliais e disfunção das mesmas, causando a liberação de moléculas vasoativas e citocinas que estimulam uma resposta inflamatória e recrutamento e migração de leucócitos dentro da parede arterial. Expressão aumentada de moléculas de adesão como a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), E-selectina e P-selectina dentro da lesão aterosclerótica estimulam o recrutamento de monócitos e transmigração dentro da íntima arterial⁽³⁹⁾, e o acúmulo de lipídios e matriz extracelular podem amplificar ainda mais a resposta inflamatória. Monócitos rapidamente maturam em macrófagos teciduais que captam lipoproteínas oxidadas através de receptores dentro do espaço subendotelial. O acúmulo de colesterol intracelular resulta na formação das características células espumosas⁽⁴⁰⁾ e estimulam macrófagos a secretar citocinas, fatores de crescimento e outros mediadores que promovem a proliferação de células musculares lisas e potencializam a resposta inflamatória levando ao remodelamento arterial.

A inflamação vascular é um processo complexo iniciado pela ativação do sistema imune levando à expressão aumentada de VEGF, ICAM 1 entre outros. Estudos pregressos demonstraram que a IL-6 divide características comuns com o VEGF, sendo que, ambos são induzidos por hipóxia e ambos têm seu papel na inflamação e permeabilidade vasculares e na angiogênese patológica.

Foi demonstrado que o vazamento vascular induzido pelo VEGF pode ser bloqueado pela administração aguda de angiopoetina1 (Ang1). Ang1 e VEGF são

fatores de crescimento endoteliais específicos. Ang-1 induz sinais angiogênicos. Existe um antagonista para a Ang-1 chamado de Ang2, que ocorre naturalmente, sendo que os dois são essenciais para o desenvolvimento vascular normal. Angiotensina II media vários efeitos pró aterogênicos na vasculatura, incluindo a super regulação da migração de monócitos, adesão de células endoteliais, proliferação e migração de células musculares lisas, além da liberação de citocinas pró inflamatórias e fatores de crescimento.

A expressão aumentada do VEGF foi relatada em camundongos transgênicos com deficiência do receptor LDL, submetidos à dieta hipercolesterolêmica comparados a camundongos controle sem deficiência de receptor. A expressão do VEGF foi encontrada nas camadas externas da retina e parecia correlacionar-se com a quantia dos lipídios presentes na MB. Em adição houve espessamento da mesma com condensação de fibras elásticas e colágenas. Vale ressaltar que a expressão do VEGF foi encontrada unicamente nos ratos com deficiência do receptor de LDL⁽¹³⁾.

O modelo vascular propõe que a DMRI é o resultado do acúmulo de lipídeos na esclera e na MB aumentando a espessura destes tecidos e aumentando a resistência pós capilar na vasculatura da coróide. Além de diminuir o fluxo coróideano, ocorre aumento da pressão hidrostática na coriocapilar aumentando o vazamento de proteínas e lipídios extracelulares, que tomam forma de depósitos basais dentro da MB e de drusas entre a MB e o EPR. O progressivo depósito de lipídios na MB resulta na degeneração de colágeno e elastina e isquemia, levando à estimulação de produção do VEGF⁽³⁶⁾.

Angiogênese e neovascularização envolvem formação e proliferação de novos vasos sanguíneos e têm um papel vital no crescimento e desenvolvimento normais na embriogênese, cicatrização e reparo tecidual⁽⁴¹⁾. Na neovascularização patológica, a angiogênese é aberrante e desregulada, resultando na formação de vasos disfuncionais, como na DMRI exsudativa. Vasos neoformados patológicos proliferam e permitem o vazamento de líquido, levando ao edema de retina, hemorragia retiniana e sub retiniana, descolamento de retina e finalmente cegueira⁽⁴²⁾.

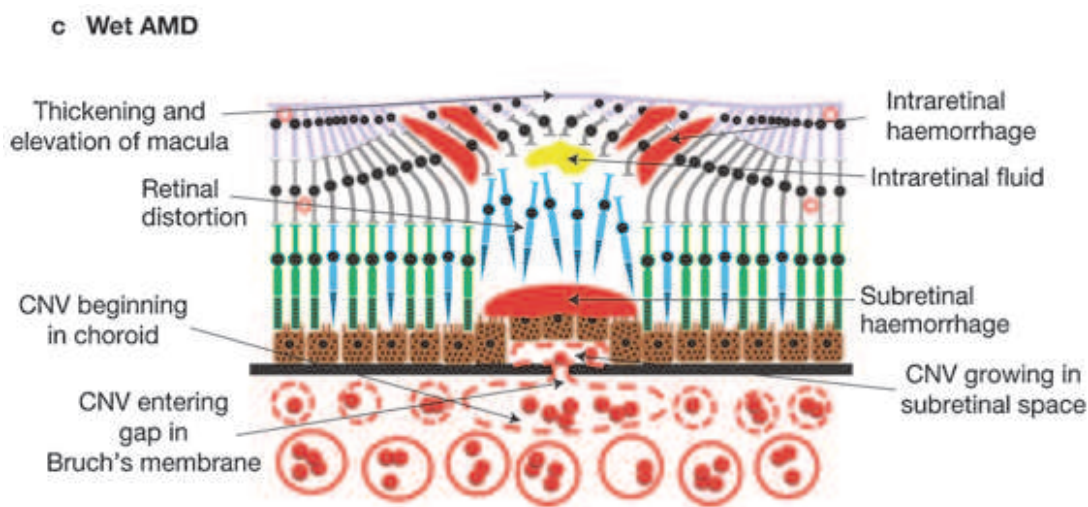


Imagem 3- DMRI Umida

Fonte: Age-related macular degeneration and the complement system

S. Khandhadia, V. Ciprianib,c, J.R.W. Yatesb,c, A.J. Loterya,d,!S.

Khandhadia et al. / Immunobiology (2011)

A hiperglicemia, produtos finais de glicação avançada e hipóxia são tidos como causadores da indução de angiogênese e neovascularização patológica dentro da retina⁽⁴³⁾. O melhor tratamento parece ser o controle adequado da DM.

Na DMRI exsudativa, a complicação ocorre pela neovascularização, envolvendo a ativação e migração de macrófagos e de células epiteliais pigmentadas retinianas quiescentes da coróide e invasão de novos vasos ineficientes no espaço sub retiniano⁽⁴⁴⁾. Ocorrem então sangramento e vazamento de lipídios destes vasos imaturos danificando a retina e levando à perda severa de visão e à cegueira. As terapias utilizadas para tratamento da DMRI são limitadas a tratar os estágios iniciais da doença e incluem a foto coagulação por laser, terapia fotodinâmica, translocação macular cirúrgica e agentes antiangiogênicos^(6, 44). Estes procedimentos invasivos são caros, requerem repetições, enquanto que a abordagem farmacológica poderia simplificar a terapia e reduzir custos⁽⁴⁵⁾.

3.2 CORÓIDE E RETINA

A retina, embriologicamente, é uma parte do sistema nervoso central que converte a energia luminosa em sinais eletroquímicos ao cérebro. É o tecido humano com o maior metabolismo e também o maior consumo de oxigênio por unidade de peso ⁽⁶⁾. Os cerca de cem milhões de cones e bastonetes localizados na superfície externa da retina são seguros pelo epitélio pigmentado da retina (EPR). Esta camada serve para várias funções essenciais, entre elas para a fagocitose diária das pontas da camada externa de fotorreceptores, manutenção da fixação da retina, metabolismo de vitamina A e coordenação da proteção imune citocina mediada. Dois sistemas vasculares suprem a retina humana. A camada interna da retina se baseia na circulação intrínseca retiniana, e os fotorreceptores e a EPR na circulação coroideana⁽⁴⁶⁾. A camada mais interna da coróide, subjacente ao EPR é a MB, que é uma lâmina fina formada por 5 camadas de tecido conectivo que provê a camada externa e a EPR com nutrientes⁽⁶⁾. A MB se localiza na divisa entre o EPR e o leito capilar primário da coróide, ou seja, a coriocapilar. Esta matriz extracelular é composta de duas camadas colágenas. Neste local ocorrem os depósitos de material celular chamados drusas, entre a lâmina basal do EPR e a camada colágena interna da MB. As drusas são fatores de risco e indicadores biológicas da DMRI. Uma das teorias é a do princípio da resposta inflamatória ou imuno mediada, incluindo o recrutamento e maturação de células dentríticas que desempenha um papel central da gênese de drusas e da DMRI. O papel das drusas não é bem estabelecido, mas elas são mais observadas em indivíduos acima de 60 anos com DMRI e é raro encontrar a mesma na ausência de drusas. A presença de drusas macias, grandes e confluentes está correlacionada com a ocorrência de neovascularização coroideana.

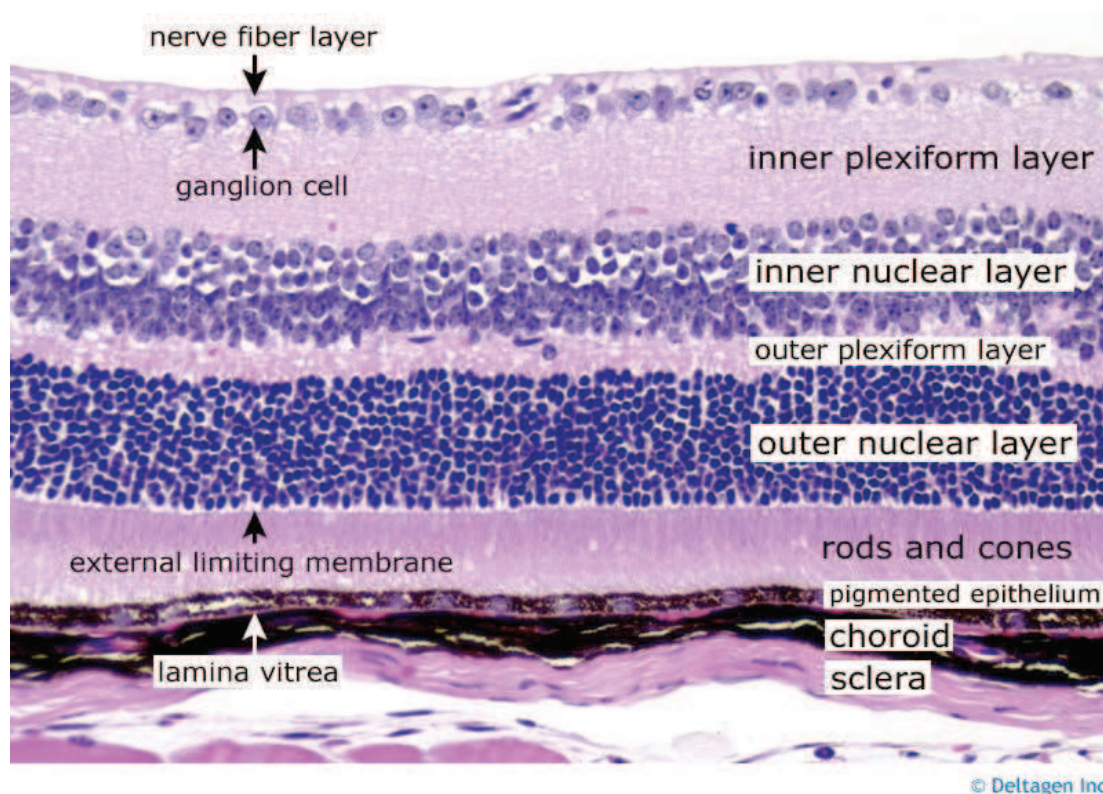


Imagem 4 – Áreas da retina

Fonte: Fonte: Age-related macular degeneration and the complement system
 S. Khandhadia, V. Ciprianib,c, J.R.W. Yatesb,c, A.J. Loterya,d,!S.
 Khandhadia et al. / Immunobiology (2011)

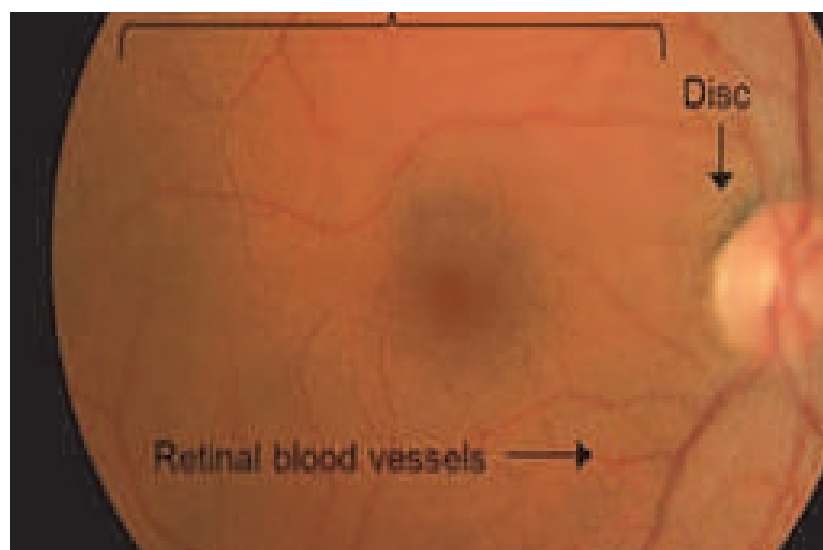


Imagem 5– Olho Normal

Age-related macular degeneration and the complement system
 S. Khandhadia V. Ciprianib,c, J.R.W. Yatesb,c, A.J. Loterya,d,!S.
 Khandhadia et al. / Immunobiology (2011)

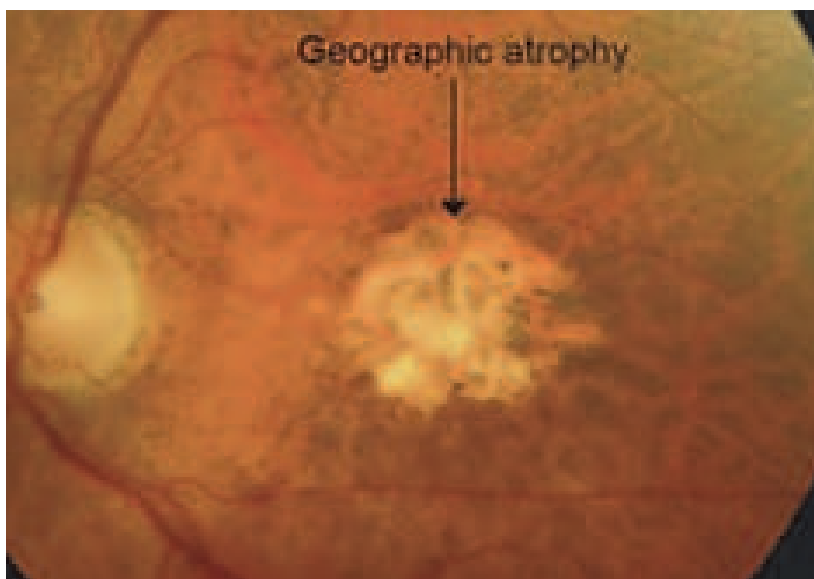


Imagem 6 – Atrófia Geográfica

Age-related macular degeneration and the complement system
S. Khandhadia, V. Ciprianib,c, J.R.W. Yatesb,c, A.J. Loterya,d,!S.
Khandhadia et al. / Immunobiology (2011)

3.3 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

A Ang II e componentes do SRA são expressos no olho⁽²⁰⁾, promovem estase leucocitária via ativação do AT1-R⁽⁴⁷⁾, que propaga mediadores proliferativos pró inflamatórios. Pelo bloqueio seletivo do AT1-R, os bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA). Por exemplo, valsartan e telmisartan têm mostrado conferir efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetivos em angiogênese e neovascularização em modelos animais.

Estudos demonstram que a liberação intra-vítrea de angiotensina II em ratos induz à expressão de VEGF e inflamação vascular⁽⁴⁸⁾.

O sistema renina angiotensina existe para manter a homeostase, o controle de volume e pressão arterial através da ativação simpática, vaso constrição, retenção de sal e água. Este mecanismo se faz através dos receptores AT1 e AT2. Nos humanos adultos a ativação dos receptores AT1 predomina nos estágios patológicos e nas retinopatias proliferativas. A ativação dos receptores AT2 geralmente tem efeitos benéficos, contrabalançando os efeitos propagados através dos receptores

AT1. Os BRA, seletivamente, bloqueiam os receptores AT1 permitindo a interação benéfica com os AT2.

Existe uma estimulação do sistema renina angiotensina concomitante com a angiogênese retiniana induzida pela hipóxia⁽⁴⁹⁾, e se relaciona a todos os mediadores inflamatórios e fatores de crescimento incluindo VEGF e PDGF⁽⁴⁹⁾.

3.4 VEGF E VEGFR-1

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF ou VEGF-A) é um dímero proteico, ou seja, formado pela interação de duas proteínas. É um sinalizador com ação autócrina e parácrina que ativa receptores transmembranares expressos principalmente em células endoteliais⁽⁵⁰⁾. É o protótipo e membro melhor descrito de um grupo de, no mínimo, 5 fatores de crescimento angiogênicos endotélio específicos. Em humanos foram identificados: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF^(50, 51). São essenciais para o desenvolvimento normal e manutenção dos sistemas vasculares e linfáticos. O VEGF estimula células endoteliais a degradar matriz extracelular, proliferar, migrar e formar condutos agindo como um fator de sobrevivência celular endotelial. A hipóxia é o gatilho que estimula o crescimento dos vasos pela sinalização de fatores de transcrição hipóxia induzidos, sendo a regulação do VEGF a mais notável, chegando a um aumento de 30 vezes em minutos em uma situação de hipóxia⁽⁵²⁾. A ação principal do VEGF se dá nas vênulas terminais e nos capilares venosos, que são vasos de pequeno calibre, que contém células endoteliais sobre uma membrana basal, tendo como cobertura uma camada descontínua de pericitos e células musculares lisas⁽⁵³⁾. O VEGF aumenta a permeabilidade vascular levando ao seu nome alternativo de fator de permeabilidade vascular. Os membros desta família exercem suas ações através de interações com 3 receptores de VEGF com 2 co-receptores conhecidos como neuropilinas⁽⁵⁴⁾. As diferentes combinações destes com seus co-receptores determinam efeitos específicos. VEGFR-1 e VEGFR-2 são primariamente envolvidos em angiogênese^(50, 55). A diversificação do VEGF durante a evolução, através do advento de múltiplos ligantes e receptores, criou uma rede decisiva de sinalização capaz de controlar a

angiogênese através da utilização de homo e hétero dímeros ativados por ligantes comuns e específicos propagando assim sinais angiogênicos diversos. Além disso, um nível adicional de diversificação angiogênica é obtido através de ativação diferencial de moléculas na sequência de cada receptor. O VEGFR-1 e VEGFR-2 são estruturalmente semelhantes⁽⁵⁰⁾. O VEGFR-1 localiza-se na superfície de células hematopoiéticas do tecido, macrófagos e monócitos, bem como no endotélio vascular, já o VEGFR-2 por sua vez, é encontrado em ambos os endotélios vascular e linfático⁽⁵⁶⁾, enquanto o VEGFR-3 se localiza, predominantemente, no endotélio linfático.

O VEGFR-1 se liga com alta afinidade ao VEGF, VEGF-B e PlGF. É expresso em células endoteliais, nos pericitos, nos monócitos e macrófagos⁽⁵⁷⁾. Sua expressão é super regulada durante hipóxia e angiogênese. A ativação do VEGFR-1 é um requisito para a migração de monócitos e a angiogênese por ele mediada é dependente dos mesmos⁽⁵⁸⁾.

Na embriogênese o sistema VEGF/VEGFR é envolvido na formação do sistema vascular e é responsável pela regulação do crescimento e sobrevivência de vasos sanguíneos⁽⁵⁵⁾. A super regulação do sistema ocorre em uma variedade de condições patológicas como em tumores e metástases, em doença coronariana e AVC e parece estimular a formação compensatória de vasos sanguíneos. Na doença isquêmica a aplicação exógena de VEGF pode estimular a formação de colaterais⁽³²⁾.

Em um pequeno estudo⁽⁵⁹⁾, foi sugerido que o VEGF sérico poderia ser um fator prognóstico para a aterosclerose em japoneses. Em alguns registros prévios, foi descrita uma correlação positiva de VEGF plasmático com hipertensão e hipercolesterolemia. A elevação do LDL induziria à expressão endotelial do VEGF e do VEGF-R⁽⁶⁰⁾. Em outro estudo o VEGF plasmático mostrou uma correlação negativa com colesterol total e LDL colesterol⁽⁶¹⁾.

3.5 VEGF E RETINOPATIA

Em olhos normais os receptores de VEGF-A estão localizados no endotélio coriocapilar, em oposição às células do EPR. A expressão tônica do VEGF-A no EPR pode ser trófica para a coriocapilar^(50, 62). No entanto os níveis de VEGF-A podem estar significativamente aumentados em pacientes com DMRI neovascular em comparação com controles. Presumivelmente, o principal fornecedor do mesmo na DMRI exsudativa é o EPR. Oxidantes demonstraram aumentar a deposição de proteínas e outros componentes oxidados na MB⁽⁶³⁾ em um processo que pode envolver ativação de complemento e inflamação provocando liberação pró angiogênica de VEGF-A.

As células de Müller poderiam ser responsáveis pelos sinais que mediam as mudanças patológicas na DM. Como o VEGF é um alvo nos estudos clínicos para tratar a DM, esta informação é de grande valia no desenho de terapias anti-VEGF⁽¹⁶⁾.

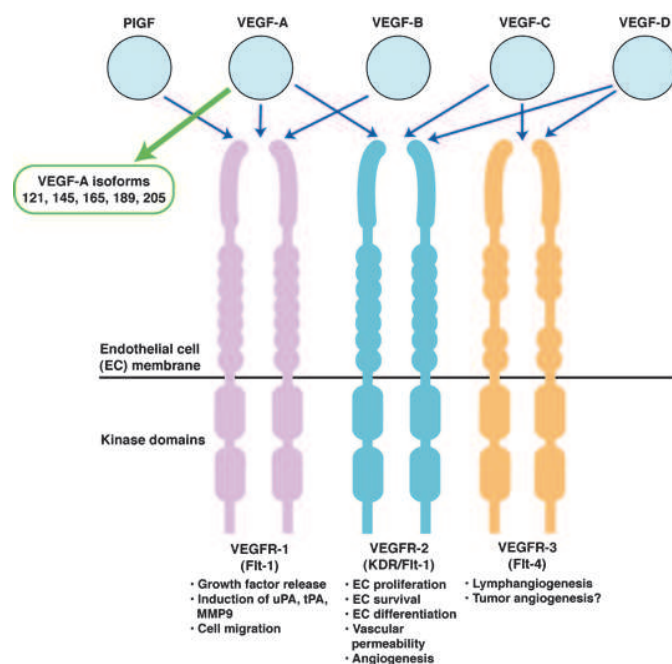


Imagem 7 - Imagem família VEGF e seus receptores

Fonte: (Ellis. Horizons in Cancer Therapeutics.2004;5(2):4-10.)

3.6 BLOQUEADORES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Existem atualmente 7 BRA, são eles: losartan, valsartan, eprosartan, irbesartan, telmisartan, olmesartan e candesartan. Candesartan é o que apresenta “in vitro” a maior afinidade pelo receptor entre os bloqueadores AT₁⁽⁶⁴⁾. Não é deslocado de sua ligação com o receptor, mesmo com altas doses de angiotensina II. Seu bloqueio potente parece ser relacionado à presença de dois grupos negativamente carregados, um carboxila e um grupo tetrazol. É um antagonista do receptor da angiotensina II, seletivo para receptores AT₁ e não apresenta atividade agonista⁽⁶⁴⁾. É apresentado como um pó branco com pKa de 2,1 e 4,6 e ponto de fusão a 163°C (decomposição). É praticamente insolúvel em água (< 0,05 µg/mL), solúvel em acetona e levemente solúvel em etanol e acetonitrila⁽⁶⁵⁾. É rapidamente hidrolisado durante a absorção no trato gastrointestinal em sua substância ativa⁽⁶⁶⁾. Possui fórmula molecular C₃₃H₃₄N₆O₆ e peso molecular 610,67. Apresenta forte ligação e fraca dissociação do receptor. Não apresenta atividade agonista⁽⁶⁷⁾. O candesartan não inibe a enzima conversora de angiotensina (ECA) que converte angiotensina I em angiotensina II e degrada bradicinina. Uma vez que não tem efeito sobre a ECA e não potencializa a bradicinina ou substância P, os antagonistas dos receptores da angiotensina II parecem não estar associados com ocorrência de tosse. Candesartan não se liga ou bloqueia outros receptores hormonais ou canais de íons conhecidos por serem importantes na regulação cardiovascular. Após a administração oral é convertido em droga ativa. Sua biodisponibilidade é baixa, em torno de 15% após a administração oral⁽⁶⁷⁾. O pico sérico de concentração máxima ocorre entre 3 e 4 horas após a ingestão do comprimido. A concentração sérica de candesartan aumenta linearmente com o aumento das doses dentro da faixa terapêutica⁽⁶⁶⁾. Liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (mais que 99%). O volume aparente de distribuição é de 0,1 l/kg. É eliminado principalmente pela via urinária e bile, sendo apenas uma pequena parte eliminada por metabolismo hepático. A meia-vida terminal é de aproximadamente 9 horas. Não há acúmulo após múltiplas doses. A depuração plasmática total é de cerca de 0,37 mL/min/kg, com uma depuração renal de cerca de 0,19 mL/min/kg.

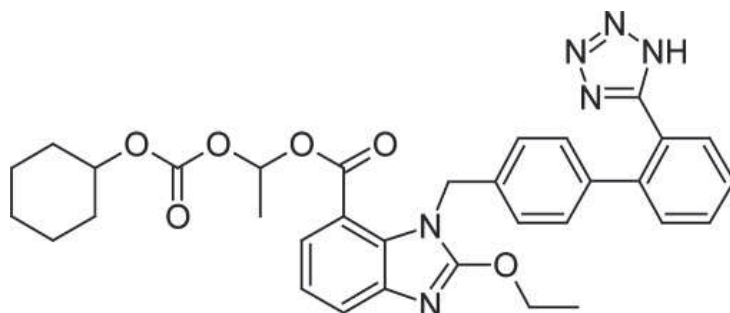


Imagem 8 – Estrutura molecular do candesartan

Fonte: (C. Detroja, S. Chavhan, and K. Sawant Sci Pharm. 2011; 79: 635–651)

3.7 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E ATEROSCLEROSE E INFLAMAÇÃO

Aterosclerose é considerada uma das doenças inflamatórias. Embora seja multifatorial em sua etiologia, o processo inflamatório desempenha um papel crucial em sua gênese⁽¹⁵⁾. A Ang II apresenta ações pró inflamatórias significativas na parede dos vasos sanguíneos, levando à progressão e desestabilização das lesões ateroscleróticas⁽⁶⁸⁾. No começo e progressão das lesões o SRA é ativado localmente e estimula a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1. Estas moléculas aceleram o recrutamento de células inflamatórias na parede vascular. Habitualmente o endotélio serve como uma barreira inflamatória contra os leucócitos. Com o estímulo da Ang II esse efeito desaparece. Após migrarem para dentro da parede vascular os monócitos transformam-se em macrófagos e contribuem para a deposição lipídica na placa. Ocorre então a secreção de quimiocinas e MMP, levando à aceleração do processo aterosclerótico. Os leucócitos recrutados servem como fontes de ROS. Os efeitos da Ang II diminuem a síntese de NO e estimulam a produção de ROS causando disfunção endotelial. A Ang II estimula a oxidação da LDL, apoptose de

células lisas e proteólise do colágeno pelas MMP e estimula a angiogênese perivascular pela expressão aumentada do VEGF.

As reações inflamatórias são envolvidas em várias doenças oculares. Durante a inflamação, várias qualidades de citocinas, tais como as interleucinas, o $\text{TNF-}\alpha$, MCP-1, ICAM-1 estão aumentadas na neovascularização corioideana. Como mecanismo celular na patogênese da mesma, a infiltração de células inflamatórias, incluindo os macrófagos desempenham um papel importante, entre outras razões por serem um rico suprimento de VEGF⁽⁶⁹⁾. A depleção farmacológica de macrófagos nos tecidos de neovascularização corioideana em modelos murinos resultou em significativa redução da mesma^(69, 70).

Receptores para Ang II estão presentes nas células endoteliais, e a Ang II age para estimular o crescimento endotelial e super regula a expressão do RNA mensageiro do VEGF. Alguns estudos sugerem que poderia haver uma relação autócrino-parácrina entre Ang II e VEGF^(47, 71). Em lesões de neovascularização corioideana extraídas de pacientes com DMRI foram encontrados macrófagos em 60% dos casos, sendo que estes expressam o $\text{TNF-}\alpha$, que é o protótipo de uma família de citocinas, sugerindo que o mesmo contribui para a angiogênese patológica através da expressão de VEGF e de ICAM-1 no endotélio vascular, da ativação do NF- κ B e pela estimulação da adesão leucocitária nas células endoteliais⁽⁷²⁾. O acúmulo de colesterol livre nos macrófagos leva à indução e secreção de $\text{TNF-}\alpha$ e de IL-6, sendo a elevação do RNA mensageiro e proteína de ambos mediada por ativação induzida pelo colesterol⁽⁷³⁾. Outro estudo demonstra que a neovascularização corioideana induz a infiltração de macrófagos sanguíneos e subsequente ativação das células de Müller na retina⁽⁷⁴⁾. A forte expressão de moléculas de adesão celular pelos vasos da retina interior sugere que os macrófagos penetram a retina através da vasculatura retiniana ativada. Após, os mesmos liberam potentes citocinas pró angiogênicas e pró inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$ ⁽⁷⁵⁾. As células endoteliais ativadas (expressando VCAM-1 e ICAM-1) coordenam o recrutamento de macrófagos, que tem um poder destrutivo maior do que as micróglia residentes. Estes macrófagos podem alterar profundamente a função retiniana causando a DMRI.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizados os animais do projeto sob o número 681, aprovado pelo CEUA da PUCPR.

4.1 AMBIENTE EXPERIMENTAL

Foram utilizadas as dependências do biotério da PUCPR e do laboratório de experimentação animal do Hospital Angelina Caron. Os animais foram submetidos a um macro-ambiente com ciclos de iluminação 12/12 horas, com trocas de ar e temperatura controlada de 19 a 23°C.

No micro-ambiente foram utilizadas gaiolas de metal, higienizadas diariamente. Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso a água e a ração. Esta era específica para a espécie (Nuvital®) e grupo do experimento ao qual o animal tinha sido designado. Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas, cada um sendo identificado com uma numeração sequencial na orelha direita, sendo esta repetida na face frontal da gaiola correspondente.

4.2 ANIMAIS

Para o experimento foram selecionados 34 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) da linhagem *New Zealand*, com cerca de 4 meses, pesando cerca de 2500 gramas. O cálculo do tamanho da amostra foi feito com base no estudo de Alessi et al.⁽⁷⁶⁾.

A duração do experimento se estendeu ao longo de seis semanas. Os animais foram randomizados de forma aleatória em três grupos: o grupo 1 (G1) composto por 9 animais, o grupo 2 (G2) com 13 animais e o grupo 3 (G3), com 12 animais.

4.3 DIETA

Os grupos receberam as seguintes dietas: o G1 recebeu dieta padrão Nuvital. O G2 recebeu a dieta padrão Nuvital acrescida à 1% de colesterol Sigma Aldrich 95%. O G3 dieta padrão Nuvital® acrescida à 1% de colesterol Sigma Aldrich 95% + candesartan

No preparo da ração foram utilizados 200g de colesterol (Sigma-Aldrich®), que foram dissolvidos em 900 ml de clorofórmio (Biotec®) e distribuídos em 20 Kg de ração Nuvital®. Esta foi armazenada separadamente e administrada aos animais após um período mínimo de 24 horas para que houvesse uma adequada evaporação do clorofórmio.

GRUPOS	QUANTIDADE DE ANIMAIS	PROCEDIMENTOS
G1	9	Animais com dieta padrão Nuvital.
G2	13	Animais com dieta padrão Nuvital, enriquecida com colesterol 1% Sigma- Aldrich 95% em todo o período do estudo.
G3	12	Animais com dieta padrão Nuvital, enriquecida com colesterol 1% Sigma- Aldrich 95% + candesartan em todo o período do estudo.

Tabela 1– Demonstrativo dos grupos, número de animais e dieta utilizada

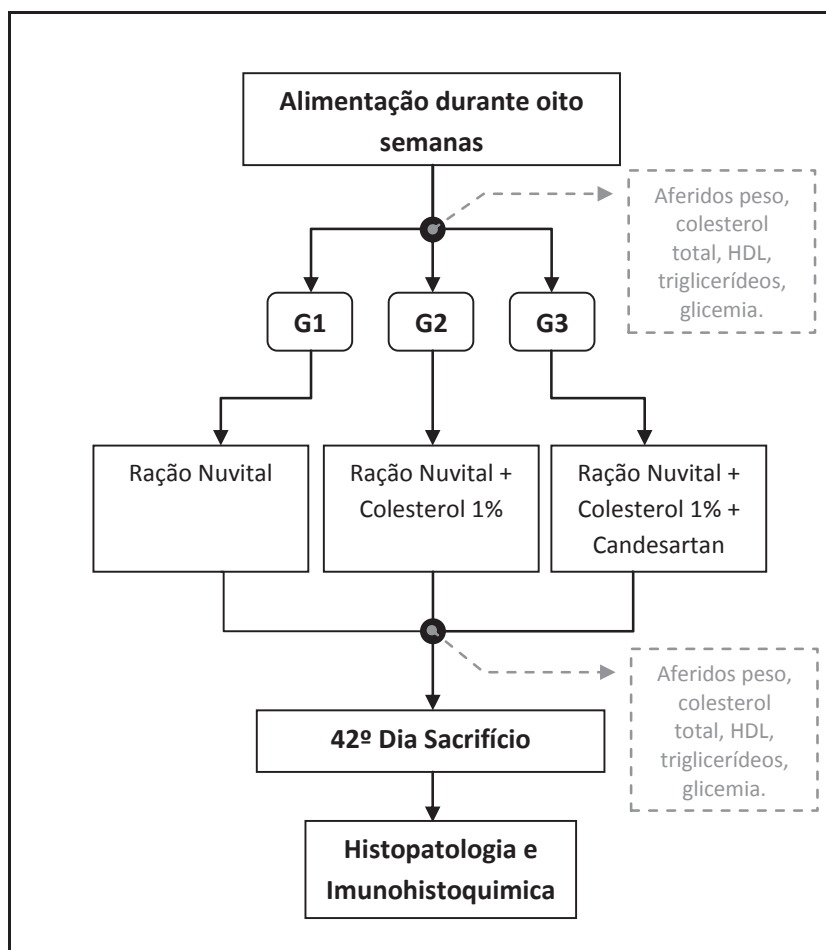


Imagem 9 – Demonstrativo do delineamento experimental

4.4 PREPARO DA RAÇÃO SUPLEMENTAR

A ração para coelho (Nuvital[®]) foi colocada em um recipiente plano e largo, distribuída numa camada fina. O colesterol diluído foi regado sob a ração, de forma homogênea.

A ração hipercolesterolêmica a 1%, utilizada nas 6 semanas do experimento, apresentava 200 gramas (g) de colesterol (Sigma-Aldrich à 95%[®]) dissolvido em 800 mililitros (ml) de clorofórmio (Biotec[®]), distribuídos em 20 quilogramas de ração Nuvital[®].

Esta ração foi preparada a cada 14 dias, esperando-se 48 horas para ser administrada aos animais. A quantidade diária ofertada para cada animal foi de 600 gramas ao dia.

4.5 CANDESARTAN

Os comprimidos de candesartan foram macerados em solução aquosa de sorbitol a 10% com pH entre 2 e 3, corrigido com tampão de ácido cítrico no momento de administração destes aos animais; A droga foi administrada por gavagem na dosagem calculada por extrapolação alométrica, considerando dose padrão de 8 mg/d para um homem.



Imagem 10 - Administração do candesartan por gavagem oral
Fonte: Arquivo Pessoal

4.6 CONTROLE DE PESO E LABORATORIAL

Os animais foram pesados no início do experimento e antes da eutanásia e tiveram coletadas amostras de sangue para a análise bioquímica do perfil lipídico (colesterol total, HDL – C, LDL – C e triglicerídeos) e do perfil glicídico

(glicemia). As dosagens das variáveis bioquímicas foram feitas por laboratório terceirizado.

4.6.1 Peso

O peso, expresso em gramas, foi avaliado em balança de precisão eletrônica e comparado no início do experimento, chamado de período basal e imediatamente antes da eutanásia (42º dia).

4.6.2 Glicemia

A glicemia, expressa em miligramas por decilitros, foi dosada pelo método enzimático colorimétrico automatizado no início do experimento, chamado de período basal e imediatamente antes da eutanásia (42º dia). A unidade foi expressa em miligramas por decilitros

4.6.3 Lipídeos

O colesterol total e HDL e os triglicerídeos, expressos em miligramas por decilitros, foram dosados pelo método enzimático colorimétrico automatizado no início do experimento, chamado de período basal e imediatamente antes da eutanásia (42º dia).

4.6.4 Análise da Esclera e Coróide

Para as avaliações desse modelo experimental foram adotadas as aferições histológicas de forma quantitativa morfométrica, qualitativa e imunohistoquímica com o VEGFR-1.

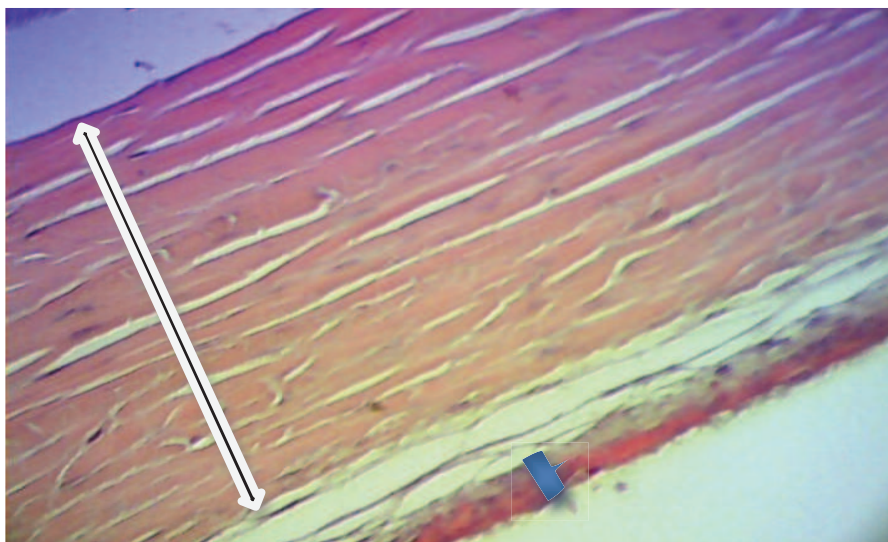


Imagem 11 – Demonstrativo de análise de esclera e coróide (coróide linha azul e esclera seta branca)

Fonte: Arquivo Pessoal

4.7 NORMAS ADOTADAS

Foram adotados os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1997), Nomina Anatômica Veterinária e pela Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). As normas de redação adotadas foram as de trabalhos científicos da PUCPR, dirigida para teses de Mestrado.

4.8 PROCEDIMENTOS

4.8.1 Anestesia

Os coelhos foram submetidos a 12 horas de jejum, então foram anestesiados com xilazina (Coopazine[®]-Coopers) na dose de 5 mg/Kg, associada à ketamina (Vetanarcol[®]-König) na dose de 3,5 mg/Kg, por via intramuscular na região da coxa direita.

Após 5 minutos foi coletado sangue para avaliação das variáveis laboratoriais.

4.8.2 Coleta de Amostras de Sangue

O sangue foi coletado no início da dieta, momento chamado basal, e antes do momento da eutanásia. Foram retirados 5 mL de sangue através de punção da veia marginal auricular magna, para as dosagens plasmáticas de lipídeos e glicemia. Soroteca com 500 microlitros de cada animal foi congelada para análises futuras.

4.8.3 Enucleação dos Globos Oculares

Os globos oculares foram enucleados imediatamente após a eutanásia dos animais. A técnica utilizada foi a realização de peritomia límbica conjuntival, com isolamento e secção dos músculos extraoculares, com tesoura. Após, foi realizada a secção do nervo óptico também com tesoura.

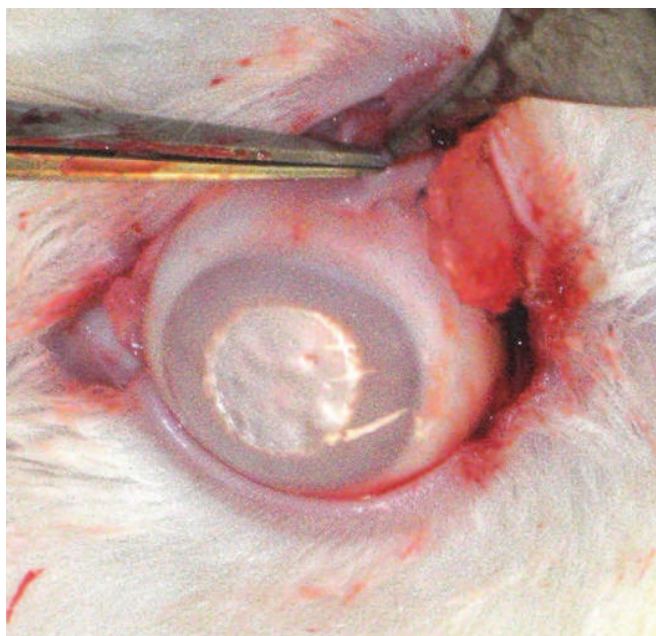


Imagem 12 - Retirada dos globos oculares
Fonte: Arquivo Pessoal

4.9 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

4.9.1 Preparo das Amostras

Os animais foram sacrificados no 42º dia com injeção endovenosa de 5 mL de pentobarbital e os olhos imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 4°C, em 0.1 M fosfato / pH 7.4 por quatro horas.

4.9.2 Análise Histológica

Foram retirados os 2 olhos de cada animal, num total de 68, e submetidos à fixação. Um dos olhos de cada animal foi utilizado para o estudo, escolhido de forma aleatória. Depois da fixação, os espécimes foram avaliados macroscopicamente. Os globos oculares foram divididos em duas metades através de uma secção coronal no nível do nervo óptico, em metade inferior e superior. A metade inferior foi estocada para estudos posteriores. A metade superior foi submetida à desidratação, diafanização e impregnação em parafina, com histotécnico marca Leica®, modelo TP 1020 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Foi utilizado o inclusor Leica®, modelo EG1160 para a confecção dos blocos de parafina, totalizando 34 blocos. Para o corte dos mesmos foi utilizado micrótomo marca Leica®, modelo RM2145, a 5 µ, para obtenção dos cortes histológicos. Estes foram pescados em lâmina de vidro com albumina. Após foram corados com hematoxilina-eosina e montados com lamínula de vidro de 24 x 90 mm Entellan, Merck® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As 34 lâminas coradas em hematoxilina-eosina foram analisadas sob o ponto de vista morfológico qualitativo, de maneira cega, sendo selecionados 34 cortes histológicos, um para cada animal do estudo, com qualidade técnica adequada para a realização da análise quantitativa. Neste momento foram selecionados os cortes histopatológicos que seriam submetidas a análise morfométrica da região esclerocoroidal, sendo medidas as espessuras da esclera e da coróide em micrômetros.

4.9.3 Análise Histomorfométrica Quantitativa da Esclera e Coróide

Para a análise quantitativa da coróide foram avaliados os cortes corados em hematoxilina-eosina previamente selecionados. Cada lâmina contendo um corte da hemisecção do olho do coelho foi dividida em 5 áreas a partir do corpo ciliar no sentido dos ponteiros de um relógio. As áreas de número 1 e 5 correspondem as próximas dos corpos ciliares, a área 3 ao nervo óptico e as áreas 2 e 4 correspondem a aquelas entre os corpos ciliares e o nervo óptico. Sendo retirada uma fotomicrografia envolvendo a esclera e a coróide, ou seja, 5 fotomicrografias por corte histopatológico utilizando-se a objetiva de 10 vezes do microscópio Olympus BX50 (Olympus, Tokyo, Japão) acoplado à câmera Sony (Sony Corporation, Tokyo, Japão) e *software* *Pró Image-plus*® (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, EUA). Em seguida foram feitas 5 medidas da espessura da esclera e 5 medidas da espessura da coróide em cada fotomicrografia, sendo então 10 medidas por fotomicrografia, consequentemente 50 medidas por corte histopatológico ou 50 medidas por animal. Essas medidas foram fornecidas automaticamente, em micrômetros, pelo programa, sendo transferidas para uma planilha de dados do Windows Excel®.



Imagem 13 - Sistema para aquisição das imagens

Fonte: Arquivo Pessoal: Microscópio olympus® bx 50 com câmara sony® e programa para morfometria pró image-plus 4,5®.

4.9.4 Análise Imunohistoquímica da Esclera e Coróide

Para a realização da análise imunohistoquímica os cortes histológicos foram desparafinados e re-hidratados. Após foi feito o bloqueio da peroxidase endógena. Então foram lavados em água deionizada e incubados em câmara úmida a 95°C por 20 minutos para que houvesse a recuperação antigênica. Após esta fase, foi feito novo bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram cobertos com o anticorpo primário monoclonal produzido em camundongo: VEGF receptor 1 da marca THERMOscientific® (diluição 1:100). Controles positivos e negativos foram usados em todas as marcações e as lâminas foram primeiramente analisadas por um observador, sem conhecimento prévio do grupo de identificação (de maneira cega). Nesta análise foi anotada a presença ou não de positividade no marcador escolhido (VEGFR-1). Nos casos que em ocorreu positividade para o marcador (VEGFR-1) foi feita a análise quantitativa pelo método da morfometria de cores, sendo marcadas as áreas positivas. Este método consistiu em analisar a área da reação positiva. Cada lâmina contendo um corte da hemisecção do olho do coelho foi dividida em 5 áreas. De cada uma destas áreas foram obtidas 5 fotomicrografias envolvendo a esclera e a coróide imunocoradas pelo anticorpo anti-VEGFR-1 em coloração castanha utilizando-se a objetiva de 20 vezes. Com o programa Adobe Photoshop® CS5 foram retirados artefatos nas fotomicrografias, que poderiam atrapalhar a morfometria destas áreas. Em seguida, utilizando o programa Pro Image-plus® 4.5 para Windows®, foram medidas as áreas imunocoradas em castanho de cada fotomicrografia, sendo que estas medidas eram fornecidas automaticamente pelo programa em micrômetros quadrados. Essas medidas foram transferidas para uma planilha de dados do Windows Excel®.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas foi considerado o modelo de análise de variância com um fator (ANOVA) e o teste LSD (least significant difference) para as comparações múltiplas. Para a comparação dos momentos de avaliação dentro de um grupo foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

Para a análise das variáveis peso, colesterol, glicemia, HDL e triglicerídeos foram considerados os resultados da avaliação inicial, da avaliação final e da diferença entre essas duas avaliações.

Inicialmente, para cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais para os três grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem média diferente dos demais. Para as variáveis que apresentaram diferença significativa entre os grupos, estes foram comparados dois a dois.

Em seguida, dentro de cada grupo, testou-se a hipótese nula de que a média na avaliação inicial é igual à média na avaliação final, versus a hipótese alternativa de médias diferentes.

5 RESULTADOS

5.1 PESO, COLESTEROL, GLICEMIA, HDL E TRIGLICERÍDEOS

Nas tabelas abaixo são apresentadas estatísticas descritivas das variáveis de acordo com os grupos e os valores de p dos testes estatísticos.

Na Tabela 1 foram observadas as variáveis: peso, glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos no momento basal. O peso inicial dos 3 grupos foi: no G1 o valor médio de 2640 g, no G2 o valor médio de 2862,3 g e no G3 de 3008,3 g. Em relação à variável peso foi observada diferença entre os grupos. Realizada a análise dos grupos dois a dois, sendo demonstra diferença do peso do G1 em relação ao G2 ($p=0,011$) e ao G3 ($p<0,001$). A glicose média nos 3 grupos foi para o G1 205,9 mg/dl, G2 196,7 mg/dl e para o G3 de 193,4 mg/dl. O CT médio no G1, G2 e G3 foi de 38,1 mg/dl, 41,3 mg/dl e 42,6 mg/dl respectivamente. O HDL médio do G1, G2 e G3 foi de 14,6 mg/dl, 18,9 mg/dl e 14,6 mg/dl respectivamente. O valor médio dos triglicerídeos no G1, G2 e G3 foi de 49,7 mg/dl, 46,5 mg/dl e 46,3 mg/dl respectivamente.

Tabela 2 - Peso e variáveis laboratoriais no momento basal

VARIAVEL	GRUPO	N	MÉDIA	VALOR DE P
Peso	G1	9	2640 ± 239	0,001
	G2	13	2862 ± 164	
	G3	12	3008 ± 174	
Glicose	G1	9	205 ± 49	0,747
	G2	13	196 ± 28	
	G3	12	193 ± 37	
Colesterol Total	G1	9	38 ± 23	0,940
	G2	13	41 ± 20	
	G3	12	42 ± 40	
HDL	G1	9	14 ± 3	0,190
	G2	13	18 ± 9	
	G3	12	14 ± 4	
Triglicerídeos	G1	9	49 ± 16	0,913
	G2	13	46 ± 16	
	G3	12	46 ± 25	

*Variáveis peso (em gramas) e variáveis laboratoriais (em miligramas por decilitros).

*HDL (lipoproteína de alta densidade)

Tabela 3—Diferença de peso nos grupos no momento basal.

GRUPOS SOB COMPARAÇÃO	PESO P
G1 x G2	0,011
G2 x G3	0,064
G3 x G1	<0,001

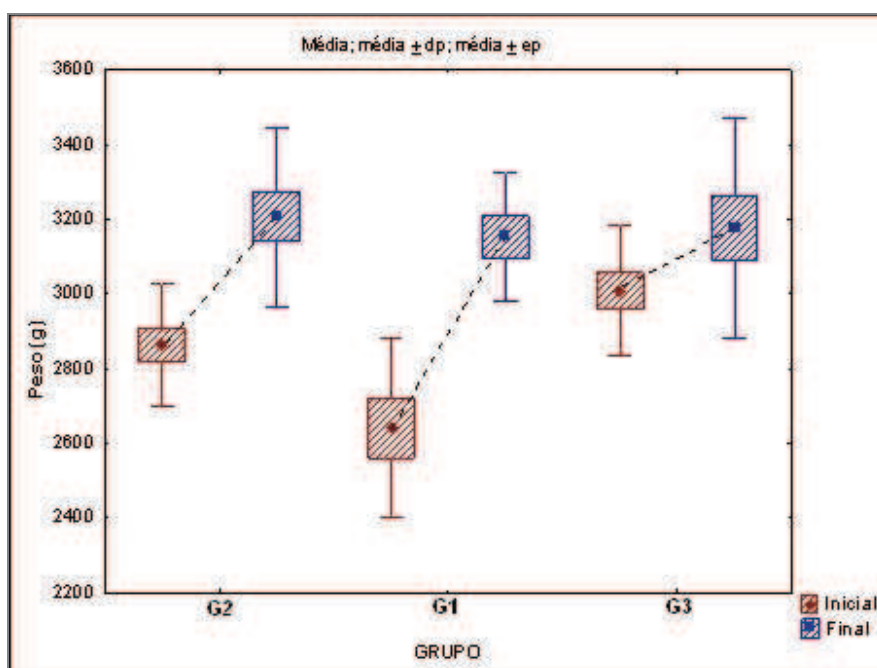


Imagem 14 - Comparação da média de peso dos coelhos no início do experimento e na eutanásia

Fonte: Tabelas 2 e 4

Na tabela 3 foi observado o peso médio inicial dos coelhos nos grupos. Realizada a análise dos grupos dois a dois, sendo demonstrada diferença do peso do G1 em relação ao G2 (p 0,011) e do G1 em relação ao G3 ($p < 0,001$). Não houve diferença do G2 em relação ao G3 (p 0,064).

Na tabela 4 foram observadas as variáveis: peso, glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos no momento da eutanásia. O peso médio final do G1, G2 e G3 foi de 3152 g, 3207 g e 3176 g respectivamente. A glicose média no G1 de 171 mg/dl, no G2 170mg/dl e no G3 de 159 mg/dl. O CT médio no G1, G2 e G3 foi de 55 mg/dl, 2147mg/dl e 924mg/dl respectivamente. O HDL médio do G1, G2 e G3 foi de 23 mg/dl, 25mg/dl e 145mg/dl respectivamente. O valor médio dos triglicerídeos no G1, G2 e G3 foi de 69 mg/dl, 168mg/dl e 172mg/dl respectivamente.

Tabela 4 - Peso e variáveis laboratoriais no momento da eutanásia

VARIAVEL	GRUPO	N	MÉDIA	VALOR DE P
Peso	G1	9	3152± 171	0,873
	G2	13	3207 ± 240	
	G3	12	3176 ± 292	
Glicose	G1	9	171 ± 31	0,723
	G2	13	170± 36	
	G3	12	159 ± 44	
Colesterol Total	G1	9	55± 29	<0,001
	G2	13	2147 ± 471	
	G3	12	924 ± 30	
HDL	G1	9	23± 9	<0,001
	G2	13	25 ± 7	
	G3	12	145 ± 45	
Triglicerídeos	G1	9	69± 17	0,077
	G2	13	168 ± 80	
	G3	12	172 ± 165	

*Variáveis peso (em gramas) e variáveis laboratoriais (em miligramas por decilitros).

*HDL (lipoproteína de alta densidade)

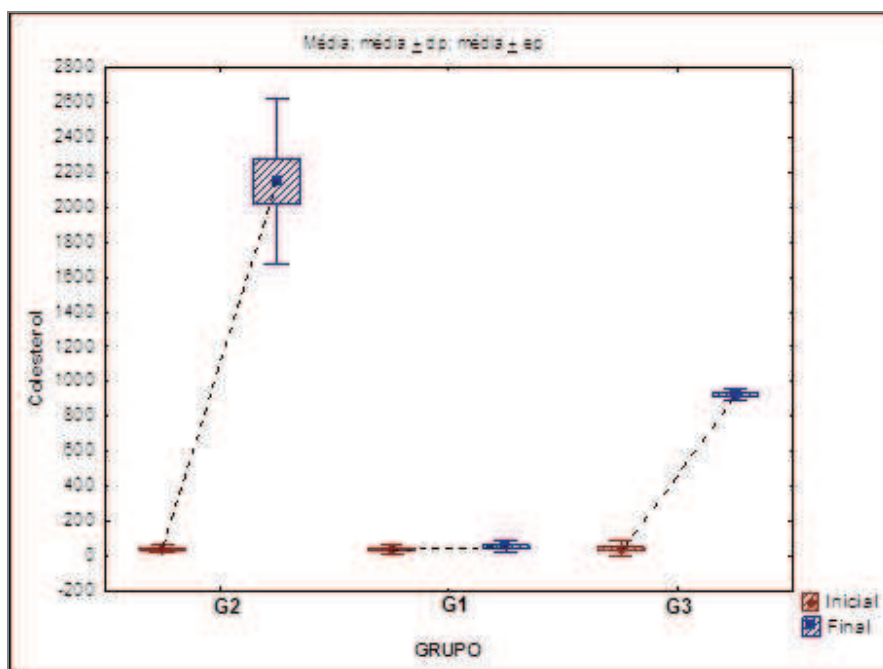


Imagem 15 - Relação de Colesterol inicial e final
Fonte: Tabelas 2 e 4

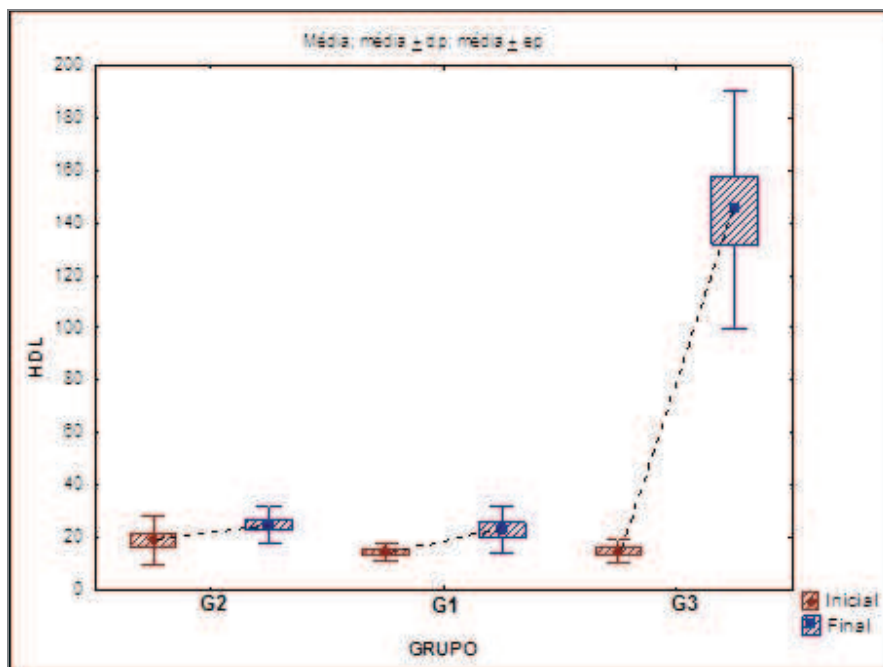


Imagem 16 - Relação de HDL no momento inicial e final
Fonte: Tabelas 2 e 4

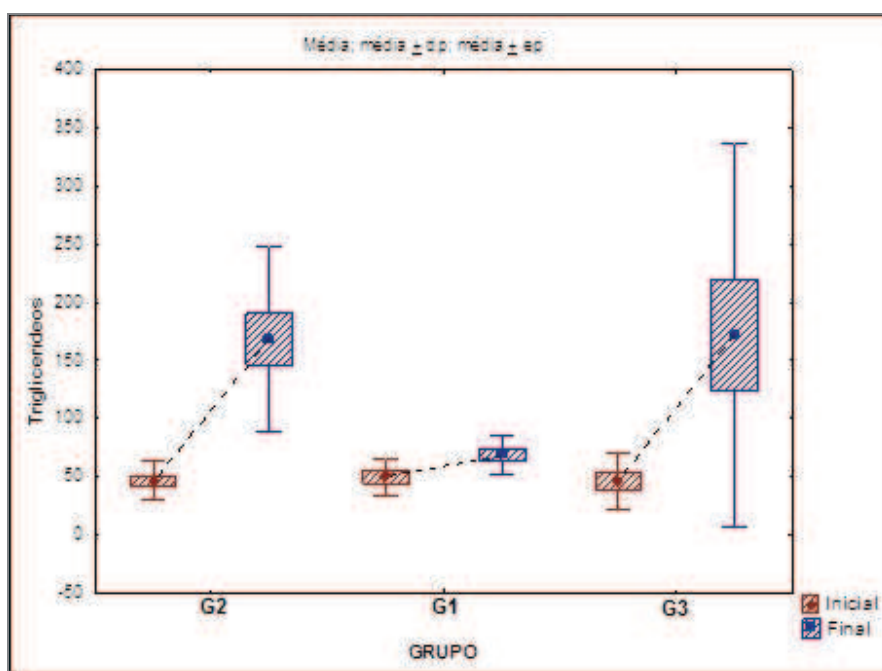


Imagem 17 – Relação de triglicerídeos no momento inicial e final
 Fonte: Tabelas 2 e 4

Na tabela 5 são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois em relação às variáveis que apresentaram significância estatística.

Tabela 5 – Diferenças de colesterol total e HDL entre os grupos no 42º dia

GRUPOS SOB COMPARAÇÃO	COLESTEROL P	HDL P
G1 x G2	<0,001	0,870
G2 x G3	<0,001	<0,001
G3 x G1	<0,001	<0,001

Em relação às variáveis colesterol total e HDL foi observada diferença entre os grupos. Realizada a análise dos grupos dois a dois, sendo demonstrada diferença do CT do G1 em relação ao G2 ($p < 0,011$), do G1 em relação ao G3 ($p < 0,001$) e também do G2 em relação ao G3 ($p < 0,001$). Também realizada a análise dos grupos dois a dois no HDL não sendo demonstrada diferença do HDL do G1 em relação ao G2 (p

0,870), no entanto, a comparação entre G1 e G3 demonstrou diferença ($p < 0,001$). Também sendo demonstrada diferença na comparação do G2 Com G3 ($p < 0,001$).

5.2 ESCLERA E CORÓIDE

As lesões subjetivamente observadas na histopatologia convencional com lâminas coradas ao HE estavam situadas basicamente na esclera subcoroideana pelo acúmulo de histiócitos espumosos. Uma vez que este acúmulo poderia aumentar a espessura destas camadas, foi realizada a análise morfométrica da espessura da esclera e da coroide para determinar, de modo mais objetivo, possíveis diferenças entre os grupos do estudo.

Na tabela 6 acompanham-se os valores da morfometria da esclera e coróide nos 3 grupos.

Tabela 6 - Morfometria da esclera e coróide

	GRUPO	N	MÉDIA	VALOR de P
ESCLERA	G1	9	437±36	0,018
	G2	13	546±123	
	G3	12	466± 69	
CORÓIDE	G1	9	31± 6	0,203
	G2	13	34± 7	
	G3	12	38± 12	

*Variável em micrometros

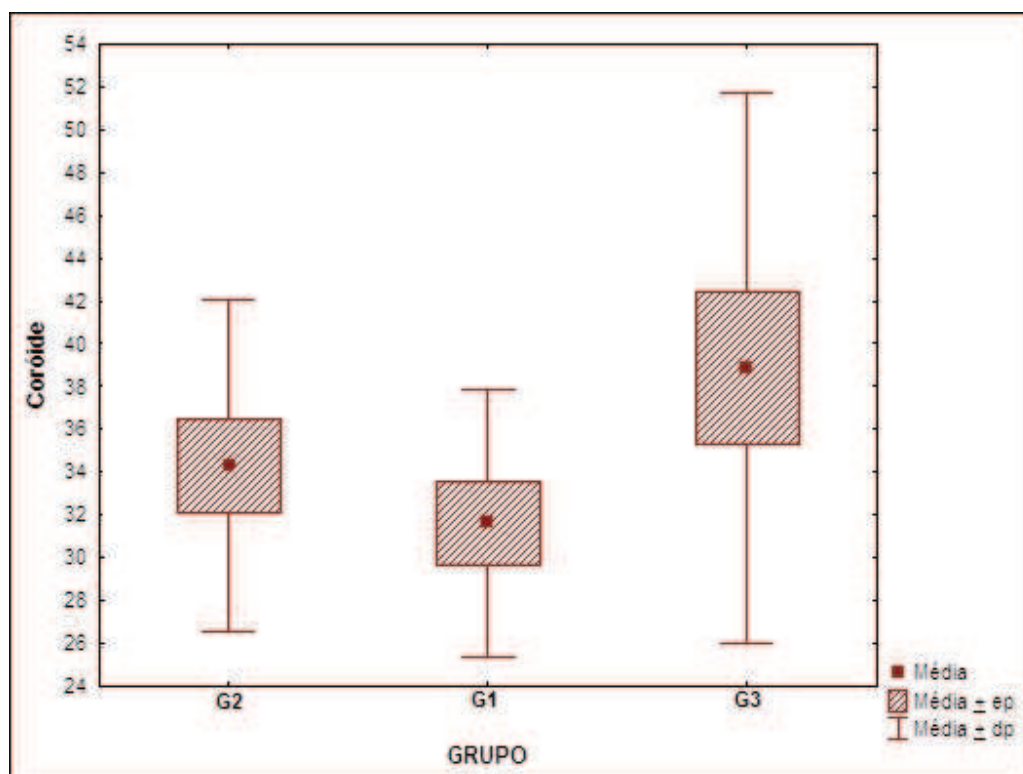


Imagem 18 – Relação média de coróide entre os grupos (dados em micrômetros)
Fonte: Tabela 6

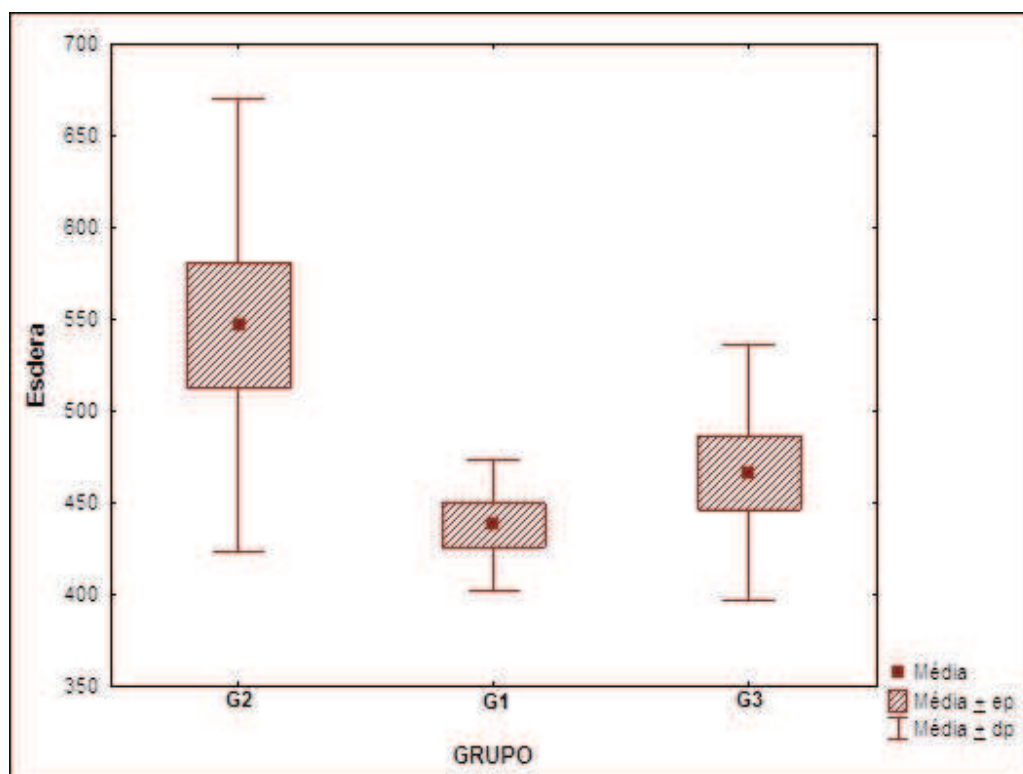


Imagem 19 – Relação média de Esclera entre os grupos (dados em micrômetros)
Fonte: Tabela 6

Como se detectou diferença entre os grupos foi realizada a comparação dois a dois.

Em relação à morfometria da esclera o G2 demonstrou diferença do G1, com valor de p de 0,008 e também do G3 com valor de p de 0,032. Não houve diferença entre o G1 e G3, obtendo-se um valor de p de 0,472. Em relação à morfometria da coróide não foi verificada diferença entre os grupos.

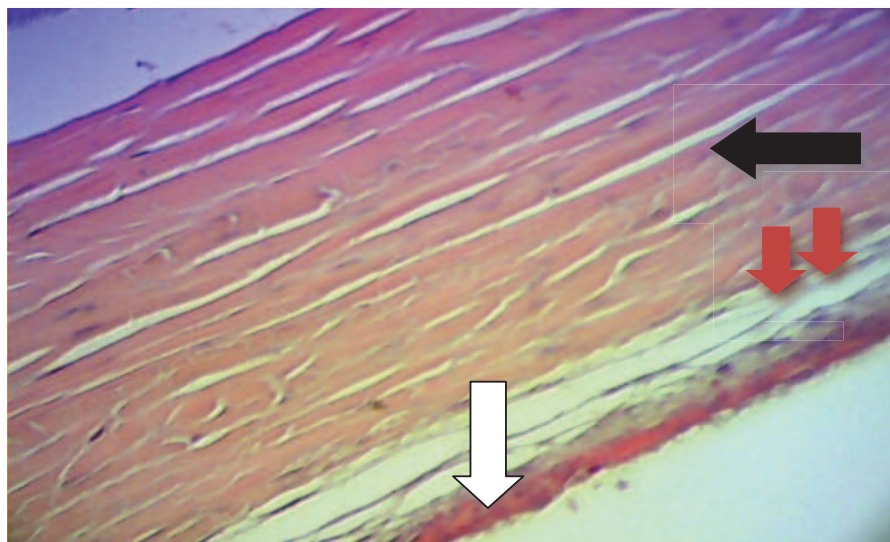


Imagem 20 – Fotomicrografia de coelho não hipercolesterolêmico que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). Observe que há raros histiócitos (seta vermelha) nestes animais.

Fonte: Arquivo Pessoal

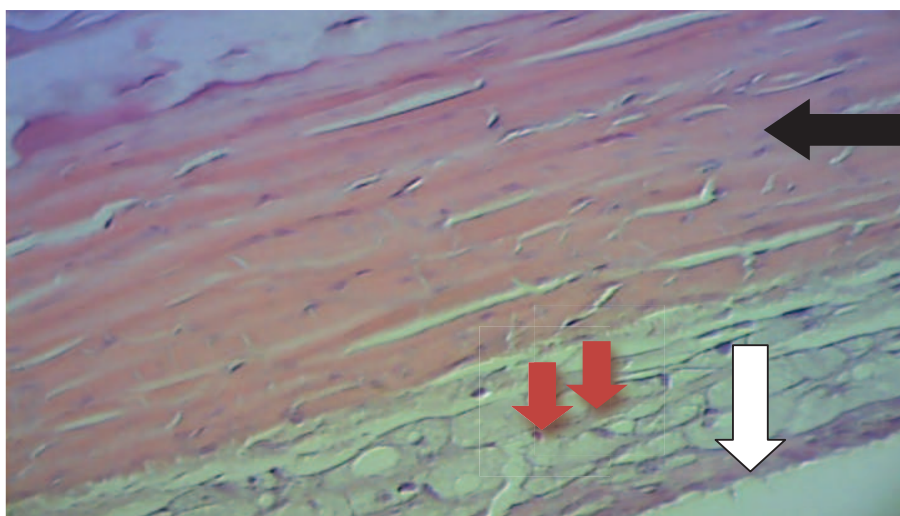


Imagem 21 – Fotomicrografia de coelho hipercolesterolêmico que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera.

Fonte: Arquivo Pessoal

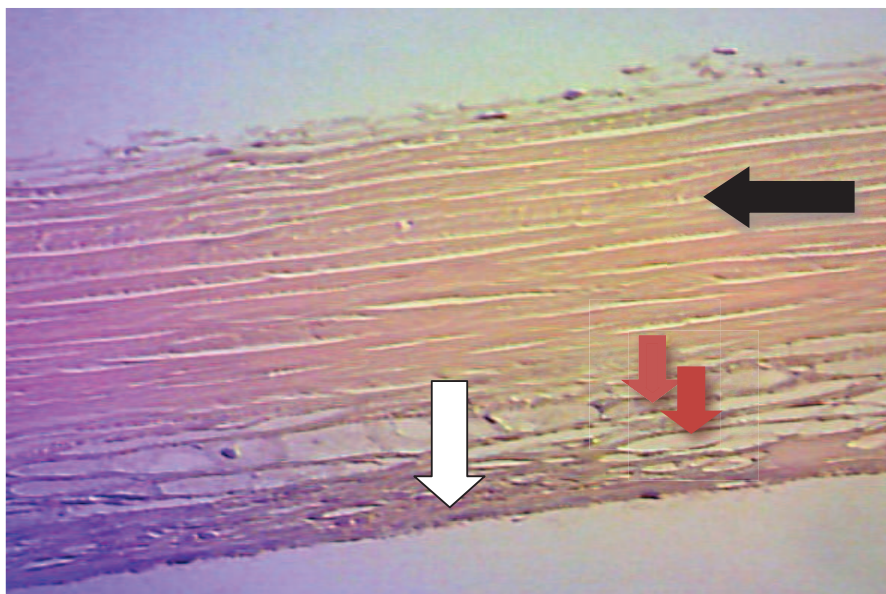


Imagem 22 – Fotomicrografia de coelho hipercolesterolêmico tratado com candesartan que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera, os quais são menos numerosos que os coelhos hipercolesterolêmicos.

Fonte: Arquivo Pessoal

5.3 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL

Tabela 7 - Imunohistoquímica para VEGFR-1 (esclera e coróide em micrometros)

GRUPO	N	MÉDIA	VALOR DE P
G1	9	28727± 11957	
G2	13	61559± 17403	
G3	12	56000 ± 14668	0,001

Considerando-se que foi encontrada diferença significativa entre os grupos, estes foram comparados dois a dois. Em relação à imunohistoquímica do VEGF o G1 demonstrou diferença do G2, com valor de p de <0,001 e também do G3 com valor de p de 0,001. Não houve diferença entre o G2 e G3, obtendo-se um valor de p de 0,377.

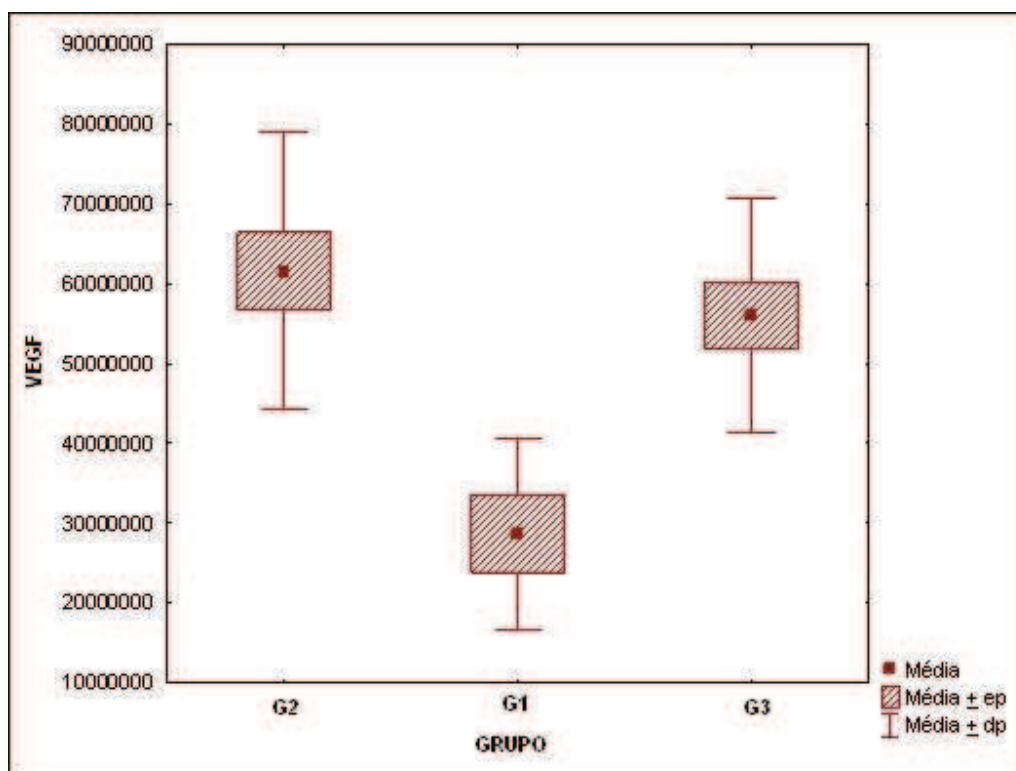


Imagem 23 : Relação de VEGFR-1 entre os três grupos (em micrometros quadrados)
Fonte:Tabela 7



Imagem 24 - Fotomicrografia da região esclerocoroidal de animal do grupo com dieta normal (G1) mostrando mínimas áreas de imunopositividade para o anti-VEGFR-1 em castanho. Observe que o acúmulo de histiócitos bem como a imunopositividade é muito menor neste grupo se comparado ao grupo hipercolesterolêmico e ao grupo tratado com candesartan

Fonte: Arquivo Pessoal



Imagem 25 - Fotomicrografia da região esclerocoroidal de animal do grupo hipercolesterolêmico (G2) mostrando áreas de imunopositividade para o anti-VEGFR-1 em castanho, localizadas no citoplasma de histiócitos espumosos agrupados na esclera . Observe que a coróide demonstra pouca imunopositividade pois não apresenta acúmulo de histiócitos espumosos

Fonte: Arquivo Pessoal



Imagem 26 - Fotomicrografia da região esclerocoroidal de animal do grupo hipercolesterolêmico + candesartan (G3) mostrando áreas de imunopositividade para o anti-VEGFR-1 em castanho, localizadas no citoplasma de histiócitos espumosos agrupados na esclera . Observe que a coróide demonstra pouca imunopositividade, pois não apresenta acúmulo de histiócitos espumosos.

Fonte: Arquivo Pessoal

6 DISCUSSÃO

6.1 O MODELO UTILIZADO

O modelo experimental em coelhos já vinha sendo utilizado na instituição em grupos de pesquisa, com experiência no modelo em questão^(26, 77, 78). Outro motivo para a escolha foi que as alterações causadas por estas lipoproteínas se fazem de maneira precoce⁽⁷⁹⁾. Em alguns dias o animal manifesta a hipercolesterolemia. Como é sensível a esta, ocorrem lesões ateromatosas, com alterações marcadas das estruturas^(77, 80). O outro ponto importante para a escolha é seu baixo custo e a facilidade de manutenção, quando comparados a outros modelos de investigação em aterosclerose, como é o caso de camundongos com deficiência para receptores de LDL colesterol^(45, 81, 82). Do ponto de vista vascular, as alterações causadas por dieta hipercolesterolêmica ocorrem tanto macroscopicamente, como no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em grandes vasos^(76, 83), alterações de microcirculação, sendo detectadas através de biomarcadores de disfunção endotelial, marcadores de inflamação e de desenvolvimento de doença aterosclerótica^(15, 84). A hipercolesterolemia induzida pela dieta é causada por um acúmulo de colesterol exógeno. Os coelhos são sensíveis a aterosclerose dieta induzida porque eles não são capazes de aumentar a excreção de esterol, resultando em liberação de lipoproteínas ricas em ésteres de colesterol na circulação, sendo os principais carreadores o LDL colesterol e o beta VLDL, sendo este último o maior transportador de colesterol quando o CT plasmático atinge os valores de 700 a 800 mg/dl⁽⁸⁵⁾. O valor de colesterol normal plasmático tem um valor médio de 46 mg/dl⁽⁸⁰⁾ e pode aumentar várias vezes depois de uma dieta enriquecida com colesterol de 0,5% a 4,0%⁽⁸³⁾. Sabendo-se que os níveis séricos em humanos apresentam variação entre 100 e 200 mg/dl, percebe-se a facilidade de promover uma sobrecarga no sistema do coelho com a dieta rica em colesterol. Neste experimento o colesterol do G1 passou de um valor médio inicial de 38 mg/dl para 55 mg/dl. O G2 passou de um valor médio de 41 mg/dl para, no momento da eutanásia, a um valor médio de 2147 mg/dl, que está de acordo com os trabalhos da literatura^(79, 80). No grupo tratado com colesterol e

candesartan (G3) ocorreu também significativo aumento do colesterol do momento basal até o 42º dia. O valor médio do colesterol do G3 inicial era de 43 mg/dl e o valor médio final de 924 mg/dl. Ao compararmos os grupos houve diferença, com significância estatística, entre G1 e G2 com valor de $p < 0,001$, G1 e G3 com $p < 0,001$, havendo ainda entre o G2 e G3 diferença, com valor de $p < 0,001$.

Vários experimentos foram realizados para demonstrar que a dieta rica em colesterol causa alterações na esclera e coróide com este tipo de suplementação^(11, 12, 86), com espessamento da MB principalmente por depósito de partículas densas e eletrolucentes na camada colágena interna⁽¹²⁾. O CT plasmático chega a níveis maiores que 1000 mg/dl, sendo as lesões resultantes formadas primariamente por células espumosas derivadas dos macrófagos⁽⁸⁷⁾. No entanto, a relação entre a formação das lesões e a dieta é mais dependente da exposição cumulativa que no nível de colesterol administrado.

Neste estudo a dosagem de colesterol administrada foi de colesterol a 1%, essa dosagem de colesterol permitiu, nesta pesquisa, obter alterações significativas da espessura da esclera do grupo tratado com dieta hipercolesterolêmica comparando com o grupo com dieta normal neste período de seis semanas, fato já descrito por Torres et al.⁽²⁴⁾ em estudo pregresso realizado na nossa linha de pesquisa.

6.2 PESO, COLESTEROL, GLICEMIA, HDL E TRIGLICERIDEOS

Em estudos experimentais, realizados utilizando dieta rica em gorduras, habitualmente são bem toleradas e os animais tanto, com dieta normal, bem como os tratados com dieta rica em gorduras e carboidratos apresentam ganhos proporcionais de peso⁽⁸⁸⁾. Estudo realizado em coelhos com dieta a 1% apresentavam peso inicial de 3200 g, após 8 semanas aumentaram para 3600 g⁽⁸⁹⁾. No atual experimento o peso do G1 tinha um valor médio de 2640 g. No final da quarta semana apresentava um valor médio de 3152 g. O G2 apresentou peso inicial

de 2862 g e peso na sexta semana de 3207 g. O G3 com valor inicial de 3008 g e no final da sexta semana de 3176 g. Havendo aumento de peso nos 3 grupos do nosso experimento, com aumento mais expressivo de peso no G1. Em estudo realizado em coelhos com dieta rica em gorduras e açúcar houve marcada elevação do colesterol total em 12 semanas de tratamento quando comparado ao grupo normal. Houve discreta elevação do HDL colesterol no grupo com dieta rica em gorduras e carboidratos. Dados que foram reproduzidos em nosso experimento. O CT do grupo tratado com dieta hipercolesterolêmica teve um valor médio de 2146,8 mg/dl. Além disso, no tratado com dieta hipercolesterolêmica acrescida de candesartan do nosso experimento, também houve um aumento do colesterol total em relação ao controle, porém com valores significativamente mais baixos que o com dieta hipercolesterolêmica isolada. O valor médio de colesterol no G3 foi de 924 mg/dl.

Em experimento similar, animais submetidos à dieta com colesterol a 1% e a 1% adicionada a candesartan, foram feitas medidas de CT com valores iniciais para o grupo dieta 1% de 42 mg/dl e de 44 mg/dl para o grupo candesartan. Após oito semanas o CT na dieta a 1% aumentou para 961 mg/dl e o acrescido de candesartan um CT de 1240 mg/dl⁽⁸⁹⁾. No nosso experimento o valor de CT no G3 foi significativamente menor que o do G2. Em relação ao HDL colesterol no nosso estudo o G1 apresentou HDL inicial de 14,6 mg/dl e final de 22,9 mg/dl. O G2 HDL inicial de 18,9 mg/dl e final de 24,9/dl, o G3 apresentou HDL inicial de 14,6 mg/dl com HDL final de 145 mg/dl. Após extensa revisão não foi obtida resposta para o dado encontrado. Aventamos a possibilidade de interferência do candesartan na precipitação da Apo B, fazendo com que houvesse erro na mensuração do HDL. Uma possibilidade para averiguar o real valor destas lipoproteínas seria através da eletroforese, com separação das mesmas.

Em relação à glicemia dos animais foi realizado estudo para evidenciar se dieta altamente gordurosa e com altas taxas de açúcar fariam ocorrer alterações aterogênicas. Nestes a glicemia inicial foi de 57 mg%, sendo os animais considerados levemente diabéticos quando os valores oscilassem entre 126 e 160 mg/dl⁽⁹⁰⁾. Em outro experimento com dieta com altas taxas de açúcar e gordura o valor inicial da glicemia foi de 104 mg/dl e após 12 semanas aumentou para 120

mg/dl⁽⁸⁸⁾. No nosso trabalho os valores de glicemia inicial para G1, G2 e G3 foram de 206 mg/dl, 197 mg/dl e 193 mg/dl respectivamente. Os resultados finais foram 171 mg//dl, 171 mg/dl e 159 mg/dl respectivamente.

Em relação aos triglicerídeos, em nosso trabalho, os valores iniciais para G1, G2 e G3 foram de 50 mg/dl, 47 mg/dl e 46 mg/dl respectivamente. Os resultados após foram para G1, G2 e G3 69 mg/dl, 169 mg/dl e 172 mg/dl respectivamente. Sendo que nossos resultados estão de acordo com as elevações em outros estudos realizados com o padrão de dieta semelhante.

6.3 FISIOPATOGENIA DA DMRI E O MODELO UTILIZADO

A DMRI é uma doença degenerativa que envolve o EPR, os fotorreceptores, a MB e a coriocapilar. A DMRI precoce ocorre pela deposição de determinadas substâncias entre a membrana basal do EPR e a MB. Experimento em coelhos com dieta acrescida de colesterol causou espessamento da membrana basal e presença de corpos densos e vacúolos. Tais achados podem causar dificuldades no transporte de oxigênio e nutrientes para os tecidos retinianos, bem como da remoção de restos celulares. Na retina exterior onde a nutrição depende da integridade dos vasos da coriocapilar e da difusão de plasma através do complexo Membrana de Bruch-epitélio pigmentar da retina situação semelhante pode ocorrer⁽¹¹⁾. Uma relação espacial próxima existe entre os vasos sanguíneos da retina e as células de Müller, sugerindo um papel importante para estas células na formação e manutenção da barreira sangue-retina, na captação de nutrientes e liberação de metabólitos em condições normais⁽⁹¹⁾. Os astrócitos, os pericitos e as células de Müller contribuem para o adequado funcionamento da barreira sangue-retina. Na ocorrência de hipóxia ocorre uma quebra da mesma associada à permeabilidade vascular aumentada, resultando em edema vasogênico e dano tecidual. Rudolf et al.⁽¹³⁾ utilizaram ratos deficientes para receptor de LDL alimentados com dieta rica em gorduras e evidenciaram partículas translúcidas, na membrana basal, com espessamento e condensação de fibras elásticas e colágenas, apresentando ainda depósitos adicionais de partículas fora da membrana, espalhadas através das camadas de

colágeno. No entanto no grupo normal nenhuma alteração foi evidenciada. Em nosso experimento a dieta hipercolesterolêmica causou espessamento da esclera às custas de aumento de histiócitos espumosos, ricos em partículas lipídicas. Schmidt-Erfurth et al.⁽⁹²⁾, utilizando camundongos deficientes em receptores de LDL comparados com camundongos selvagens com idade de 8 meses, alimentados com dieta altamente gordurosa, evidenciaram espessamento da membrana basal, redução do número de fenestrações endoteliais e estreitamento luminal. A MB apresentou espessamento, com perda da estrutura regular, com pronunciada degeneração da mesma. Nesta o número de inclusões lipídicas aumentaram em número e tamanho. Apresentando ainda redução da altura das células epiteliais pigmentadas da retina, evidenciando degeneração focal e formação de vacúolos nas camadas fotorreceptoras externas.

O colesterol é constantemente retirado da circulação pela retina via receptores de LDL em adição à sua síntese endógena. Na dieta hipercolesterolêmica ocorre acúmulo de colesterol na retina, sendo seu excesso um fator deletério. Para retirar o colesterol das células ocorrem vários mecanismos entre eles a difusão passiva, também pela conversão à oxisteróis, e pelo transporte reverso de colesterol. A MB é um tecido conectivo composto por 5 camadas, sendo responsável por varias funções de transporte e suporte entre o EPR e a coriocapilar. O acúmulo de lipídios na MB aumenta sobremaneira sua espessura⁽¹³⁾, reduzindo a condutibilidade hidráulica e prejudicando o aporte de nutrientes da coriocapilar para as células do EPR e fotorreceptores, interferindo na passagem de metabólitos do EPR para a coriocapilar, com já foi demonstrado em estudo realizado na linha de pesquisa desta instituição⁽²⁶⁾. No presente experimento encontramos espessamento significativo da esclera dos coelhos do G2 comparado ao G1 com valor de p de 0,008, não havendo, no entanto, elevação no G3 quando comparado ao G1, com valor de p de 0,472. Ao compararmos os dois grupos tratados com colesterol a 1% percebemos uma diferença significativa no grupo que teve acrescido o candesartan na dieta, mantendo-se este grupo com a espessura da esclera semelhante ao grupo normal. Tendo em vista a relevância deste fato sugere-se um efeito protetivo do candesartan neste grupo. Não houve diferença estatisticamente significante da espessura da

coroide no nosso experimento quando comparamos os 3 grupos.

6.4 VEGF

A aterosclerose é uma doença multifatorial e existem várias teorias para explicá-la. Entre elas destacam-se a teoria lipídica e a teoria inflamatória. No nosso experimento, utilizamos um modelo que explora as duas vertentes. Na medida em que foi oferecida uma sobrecarga de colesterol, propiciando a teoria lipídica, mas ao mesmo tempo, desencadeando alterações de cunho inflamatório. O colesterol que acaba por depositar-se na membrana basal acarreta alterações estruturais que dificultam sua função causando dano hipóxico e desencadeando a cascata inflamatória como já descrita em outros estudos^(14, 16, 17, 62, 93). A inflamação ocorre em condições hipóxicas, induzindo a expressão gênica de MCP-1, que tem a função de atrair macrófagos para a área hipóxica. Estes macrófagos e as micróglia estimulado liberam TNF- α , que é um gatilho para a produção de IL-8. A IL-8 e o TNF- α estimulam a liberação de VEGF⁽⁹⁴⁾. Foi sugerido que as citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel importante na degeneração dos capilares retinianos⁽⁹⁵⁾. A adesão dos leucócitos ao endotélio vascular hipóxico pode ocorrer através da expressão de quimiocinas nos vasos, com subsequente transmigração para as camadas retinianas interiores.

O VEGF, também chamado de fator de permeabilidade vascular, é conhecido por aumentar a permeabilidade vascular em vários tecidos do corpo. Sob condições de hipóxia, as células de Müller aumentam sensivelmente sua secreção de VEGF⁽⁹⁶⁾. Em condições normais elas secretam PDEF, que é conhecido por seu antagonismo ao VEGF.

A expressão do VEGF é potencializada em resposta à hipóxia. sua expressão aumentada na retina hipóxica foi documentada, e as células consideradas como expressoras do VEGF foram as células de Müller e os astrócitos. A ativação do VEGFR-1 e VEGFR-2 podem ser importantes na patogênese da disfunção da barreira retina-sangue⁽⁹⁶⁾. O VEGF promove vazamento de proteínas plasmáticas dos vasos sanguíneos. Foi demonstrado haver aumento da permeabilidade através da

liberação de NO em estudo realizado em camundongos deficientes em receptor de LDL, comparados a camundongos sem esta deficiência, tratados com dieta rica em gorduras. Evidenciaram ainda positividade para o VEGF localizados predominantemente no EPR basal, na camada plexiforme externa e nos segmentos fotorreceptores internos⁽¹⁰⁾. Em nosso experimento o VEGFR-1 do G2 apresentou um aumento significativo quando comparado ao G1 com $p < 0,001$. O VEGFR-1 do G3 também apresentou elevação significante em relação ao G1 com valor de p de 0,001. Não houve diferença entre o G2 e o G3 com valor de p de 0,377. Os grupos que tiveram dieta enriquecida com colesterol a 1% apresentaram elevação importante de VEGF, fato este já comprovado em estudos de hipercolesterolemia⁽³³⁾. A hipercolesterolemia é caracterizada por aumento do estresse oxidativo, alteração na biodisponibilidade de NO e elevação de VEGF⁽⁶⁰⁾. Em contrapartida, em estudo realizado por Sandhofer et al. em voluntários saudáveis não foi encontrada correlação entre colesterol e elevação de VEGF⁽⁶¹⁾. Em nosso experimento não houve diferença estatística entre G2 e G3. Uma possibilidade aventada foi que a dieta com colesterol a 1% causaria uma sobrecarga tamanha no metabolismo do coelho que a utilização do BRA em questão não impediria a elevação do VEGF, e que talvez com uma dose menor de colesterol seu efeito pudesse ocorrer de maneira efetiva.

6.5 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E O MODELO UTILIZADO

O SRA está envolvido no processo da neovascularização coroideana. Seus componentes estão presentes em CNV humana e em modelos murinos, fato demonstrado por Nagai et al.⁽²²⁾ em estudo experimental de indução de CNV, no qual a mesma foi suprimida pelo bloqueio do AT1-R. O mecanismo pelo qual houve a supressão foi através da inibição da infiltração de macrófagos e na expressão de moléculas relacionadas à inflamação no complexo EPR-córóide, entre elas o VEGF, ICAM-1, MCP-1, VEGFR-1 E IL-6. O mesmo autor ainda realizou estudos experimentais in vitro com o BRA telmisartan demonstrando redução dos níveis de VEGF e IL-6 em células endoteliais⁽²²⁾. Em outro estudo Fukuda et al.⁽⁴⁵⁾ também

demonstraram o papel benéfico do bloqueio do SRA com telmisartan em ratos hipercolesterolêmicos. Sata e Fukuda⁽¹⁵⁾ utilizando o BRA olmesartan, suprimiram o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em artérias de camundongos deficientes em ApoE. Em estudo realizado em primatas submetidos à dieta hipercolesterolêmica comparando-se o BRA candesartan com um antagonista de cálcio, demonstrou-se redução de aterosclerose em artérias independente do valor de redução da pressão arterial, que foi semelhante nos 2 grupos tratados, sugerindo que o bloqueio do SRA causa efeito protetivo na aterogênese⁽⁹⁷⁾. A utilização do candesartan em modelos de ratos diabéticos reduziu a expressão de VEGF na retina dos mesmos quando comparados ao grupo não tratado⁽⁸¹⁸¹⁾. Em nosso experimento a utilização do candesartan não modificou a elevação no VEGFR-1 no complexo esclero-coroideano do grupo tratado.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, pudemos comprovar que a dieta hipercolesterolêmica provoca alterações degenerativas em escleras de coelhos, sem alterações significativas na coróide. A utilização de candesartan resultou em atenuação do espessamento das escleras, entretanto, não foi efetiva em prevenir a infiltração de macrófagos e histiócitos, assim como o acúmulo de VEGF.

REFERÊNCIAS

1. Chakravarthy U, Evans J, Rosenfeld PJ. Age related macular degeneration. *BMJ*. 2010;340:c981. Epub 2010/03/02.
2. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):564-72. Epub 2004/04/14.
3. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Munoz B, Friedman DS, et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):477-85. Epub 2004/04/14.
4. Connell PP, Keane PA, O'Neill EC, Altaie RW, Loane E, Neelam K, et al. Risk factors for age-related maculopathy. *J Ophthalmol*. 2009;2009:360764. Epub 2009/01/01.
5. Klein R, Chou C, Klein B, Zhang X, Meuer S, Saaddine J. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the US Population. *Archives of Ophthalmology*. 2011;129(1):75.
6. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep*. 2006;58(3):353-63. Epub 2006/07/18.
7. van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT. The risk and natural course of age-related maculopathy: follow-up at 6 1/2 years in the Rotterdam study. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(4):519-26. Epub 2003/04/16.
8. Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M, Vernet MH. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol*. 2001;8(4):237-49. Epub 2001/07/27.
9. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Cruickshanks KJ. The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2003;110(6):1273-80. Epub 2003/06/12.
10. Rudolf M, Curcio CA. Esterified cholesterol is highly localized to Bruch's membrane, as revealed by lipid histochemistry in whole mounts of human choroid. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(8):731-9. Epub 2009/04/15.

11. Trivino A, Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Padilla E, et al. A cholesterol-enriched diet induces ultrastructural changes in retinal and macroglial rabbit cells. *Exp Eye Res.* 2006;83(2):357-66. Epub 2006/04/04.
12. Ramirez AI, Salazar JJ, De Hoz R, Rojas B, Ruiz E, Tejerina T, et al. Macroglial and retinal changes in hypercholesterolemic rabbits after normalization of cholesterol levels. *Exp Eye Res.* 2006;83(6):1423-38. Epub 2006/09/30.
13. Rudolf M, Winkler B, Aherrahou Z, Doebling LC, Kaczmarek P, Schmidt-Erfurth U. Increased expression of vascular endothelial growth factor associated with accumulation of lipids in Bruch's membrane of LDL receptor knockout mice. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(12):1627-30. Epub 2005/11/22.
14. Suner IJ, Espinosa-Heidmann DG, Marin-Castano ME, Hernandez EP, Pereira-Simon S, Cousins SW. Nicotine increases size and severity of experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(1):311-7. Epub 2003/12/24.
15. Sata M, Fukuda D. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Med Invest.* 2010;57(1-2):12-25. Epub 2010/03/20.
16. Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ. Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes.* 2010;59(9):2297-305. Epub 2010/06/10.
17. Yamada K, Sakurai E, Itaya M, Yamasaki S, Ogura Y. Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemotactic protein-1 synthesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(4):1839-43. Epub 2007/03/29.
18. Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Jousseaume AM, Fernandez A, Meyer TN, et al. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol.* 2001;158(3):1161-72. Epub 2001/03/10.
19. Izumi-Nagai K, Nagai N, Ozawa Y, Mihara M, Ohsugi Y, Kurihara T, et al. Interleukin-6 receptor-mediated activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) promotes choroidal neovascularization. *American Journal of Pathology.* 2007;170(6):2149-58.
20. Sarlos S, Wilkinson-Berka JL. The renin-angiotensin system and the developing retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(3):1069-77. Epub 2005/02/25.

21. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(7):367-74. Epub 2008/06/27.
22. Nagai N, Oike Y, Izumi-Nagai K, Urano T, Kubota Y, Noda K, et al. Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arterioscl Thromb Vas*. 2006;26(10):2252-9.
23. Nagai N, Oike Y, Izumi-Nagai K, Koto T, Satofuka S, Shinoda H, et al. Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: Minimal role of bradykinin. *Invest Ophth Vis Sci*. 2007;48(5):2321-6.
24. Torres RJ, Maia M, Noronha L, Farah ME, Luchini A, Brik D, et al. [Evaluation of choroid and sclera early alterations in hypercholesterolemic rabbits: histologic and histomorphometric study]. *Arq Bras Oftalmol*. 2009;72(1):68-74. Epub 2009/04/07. Avaliacao das alteracoes precoces na corioide e esclera ocorridas em coelhos hipercolesterolemicos: estudo histologico e histomorfometrico.
25. Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res*. 1997;37(24):3483-93. Epub 1998/01/13.
26. Torres RJ, Muccioli C, Maia M, Noronha L, Luchini A, Alessi A, et al. Sclerochorioretinal abnormalities in hypercholesterolemic rabbits treated with rosiglitazone. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2010;41(5):562-71. Epub 2010/08/28.
27. Dasari B, Prasanthi JR, Marwarha G, Singh BB, Ghribi O. Cholesterol-enriched diet causes age-related macular degeneration-like pathology in rabbit retina. *BMC Ophthalmol*. 2011;11:22. Epub 2011/08/20.
28. Wang L, Mehta S, Gillis C, Law C, Taneja R. Modulation of neutrophil apoptosis by murine pulmonary microvascular endothelial cell inducible nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010.
29. Fukuda K, Hirooka K, Mizote M, Nakamura T, Itano T, Shiraga F. Neuroprotection against retinal ischemia-reperfusion injury by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(7):3629-38. Epub 2010/02/19.
30. Yucel I, Akar Y, Yucel G, Ciftcioglu MA, Keles N, Aslan M. Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. *Vision Res*. 2005;45(9):1107-14. Epub 2005/02/15.

31. Dugas B, Charbonnier S, Baarine M, Ragot K, Delmas D, Menetrier F, et al. Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr.* 2010;49(7):435-46. Epub 2010/03/27.
32. Moreira EF, Larrayoz IM, Lee JW, Rodriguez IR. 7-Ketocholesterol is present in lipid deposits in the primate retina: potential implication in the induction of VEGF and CNV formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(2):523-32. Epub 2008/10/22.
33. Blann AD, Belgore FM, Constans J, Conri C, Lip GY. Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of fluvastatin or fenofibrate. *Am J Cardiol.* 2001;87(10):1160-3. Epub 2001/05/18.
34. Ebrahimi KB, Handa JT. Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration. *J Lipids.* 2011;2011:802059. Epub 2011/08/09.
35. Striker GE, Praddaude F, Alcazar O, Cousins SW, Marin-Castano ME. Regulation of angiotensin II receptors and extracellular matrix turnover in human retinal pigment epithelium: role of angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(6):C1633-46. Epub 2008/10/17.
36. Friedman E. The role of the atherosclerotic process in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 2000;130(5):658-63. Epub 2000/11/18.
37. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20(6):705-32. Epub 2001/10/06.
38. Petnehazy T, Stokes KY, Russell JM, Granger DN. Angiotensin II type-1 receptor antagonism attenuates the inflammatory and thrombogenic responses to hypercholesterolemia in venules. *Hypertension.* 2005;45(2):209-15. Epub 2005/01/19.
39. Faggitto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis.* 1984;4(4):323-40. Epub 1984/07/01.
40. Frontini MJ, O'Neil C, Sawyez C, Chan BM, Huff MW, Pickering JG. Lipid incorporation inhibits Src-dependent assembly of fibronectin and type I collagen by vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2009;104(7):832-41. Epub 2009/02/21.

41. Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J*. 2005;81(954):236-42. Epub 2005/04/07.
42. Khandhadia S, Cipriani V, Yates JR, Lotery AJ. Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology*. 2012;217(2):127-46. Epub 2011/08/27.
43. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2653-64. Epub 2003/08/28.
44. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):598-614. Epub 2004/04/14.
45. Fukuda D, Enomoto S, Hirata Y, Nagai R, Sata M. The angiotensin receptor blocker, telmisartan, reduces and stabilizes atherosclerosis in ApoE and AT1aR double deficient mice. *Biomed Pharmacother*. 2010;64(10):712-7. Epub 2010/10/26.
46. Curcio CA, Johnson M, Huang JD, Rudolf M. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J Lipid Res*. 2010;51(3):451-67. Epub 2009/10/03.
47. Chen P, Scicli GM, Guo M, Fenstermacher JD, Dahl D, Edwards PA, et al. Role of angiotensin II in retinal leukostasis in the diabetic rat. *Exp Eye Res*. 2006;83(5):1041-51. Epub 2006/07/11.
48. Chen P, Guo AM, Edwards PA, Trick G, Scicli AG. Role of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(4):R1619-29. Epub 2007/07/27.
49. Otani A, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Matsumura M, Ikeda E, et al. Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(5):1192-9. Epub 2001/02/07.
50. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*. 2009;89(2):607-48. Epub 2009/04/04.
51. de Paulis A, Prevete N, Fiorentino I, Rossi FW, Staibano S, Montuori N, et al. Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J Immunol*. 2006;177(10):7322-31. Epub 2006/11/04.

52. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653-60. Epub 2003/06/05.
53. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 2001;153(3):543-53. Epub 2001/05/02.
54. Fantin A, Schwarz Q, Davidson K, Normando EM, Denti L, Ruhrberg C. The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Development.* 2011;138(19):4185-91. Epub 2011/08/20.
55. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407(6801):242-8. Epub 2000/09/23.
56. Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, Mehta D, Urao N, Kim HW, et al. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res.* 2008;102(10):1182-91. Epub 2008/05/03.
57. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):550-63. Epub 2005/01/25.
58. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res.* 2003;92(4):378-85. Epub 2003/02/26.
59. Kimura K, Hashiguchi T, Deguchi T, Horinouchi S, Uto T, Oku H, et al. Serum VEGF--as a prognostic factor of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007;194(1):182-8. Epub 2006/12/05.
60. Rodriguez JA, Nespereira B, Perez-Illarbe M, Eguinoa E, Paramo JA. Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):665-73. Epub 2005/01/25.
61. Sandhofer A, Tatarczyk T, Kirchmair R, Iglseder B, Paulweber B, Patsch JR, et al. Are plasma VEGF and its soluble receptor sFlt-1 atherogenic risk factors? Cross-sectional data from the SAPHIR study. *Atherosclerosis.* 2009;206(1):265-9. Epub 2009/02/25.

62. Ida H, Tobe T, Nambu H, Matsumura M, Uyama M, Campochiaro PA. RPE cells modulate subretinal neovascularization, but do not cause regression in mice with sustained expression of VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(12):5430-7. Epub 2003/11/26.
63. Mauer M, Zinman B, Gardiner R, Suissa S, Sinaiko A, Strand T, et al. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2009;361(1):40-51. Epub 2009/07/03.
64. Vanderheyden PM, Fierens FL, Vauquelin G. Angiotensin II type 1 receptor antagonists. Why do some of them produce insurmountable inhibition? *Biochem Pharmacol.* 2000;60(11):1557-63. Epub 2000/11/15.
65. Fierens FL, Vanderheyden PM, De Backer JP, Vauquelin G. Insurmountable angiotensin AT1 receptor antagonists: the role of tight antagonist binding. *Eur J Pharmacol.* 1999;372(2):199-206. Epub 1999/07/08.
66. De Rosa ML. Cardio classics revisited--focus on the role of candesartan. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:1047-63. Epub 2010/12/31.
67. Detroja C, Chavhan S, Sawant K. Enhanced antihypertensive activity of candesartan cilexetil nanosuspension: formulation, characterization and pharmacodynamic study. *Sci Pharm.* 2011;79(3):635-51. Epub 2011/09/03.
68. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138(5 Pt 2):S419-20. Epub 1999/10/28.
69. Izumi-Nagai K, Nagai N, Ohgami K, Satofuka S, Ozawa Y, Tsubota K, et al. Inhibition of choroidal neovascularization with an anti-inflammatory carotenoid astaxanthin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(4):1679-85. Epub 2008/04/04.
70. Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):23-8. Epub 2003/10/04.
71. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW. Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(8):3586-92. Epub 2003/07/29.
72. Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(3):311-5. Epub 2002/02/28.

73. Jasielska M, Semkova I, Shi X, Schmidt K, Karagiannis D, Kokkinou D, et al. Differential role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha receptors in the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(8):3874-83. Epub 2010/03/26.
74. Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, Yao PM, Gerbod-Giannone MC, Tall AR, et al. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2005;280(23):21763-72. Epub 2005/04/14.
75. Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Pina Y, Hernandez EP, Cousins SW. Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Muller glial cells under experimental choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2005;81(1):38-47. Epub 2005/06/28.
76. Alessi A, Franca Neto OR, Brofman PR, Prim C, Noronha L, Silva RF, et al. Use of rosiglitazone before and after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: Assessment of neointimal formation. *Thromb J*. 2008;6:12. Epub 2008/08/30.
77. Alessi A, Franca Neto OR, Prim C, Silva RF, Noronha L, Brofman PR, et al. Rosiglitazone and vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: neointimal formation assessment. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(3):283-8. Epub 2010/08/03.
78. Torres RJ, Maia M, Precoma DB, Noronha L, Luchini A, Precoma LB, et al. Evaluation of early abnormalities of the sensory retina in a hypercholesterolemia experimental model: an immunohistochemical study. *Arq Bras Oftalmol*. 2009;72(6):793-8. Epub 2010/01/26.
79. Madhumathi BG, Venkataranganna MV, Gopumadhavan S, Rafiq M, Mitra SK. Induction and evaluation of atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *Indian J Exp Biol*. 2006;44(3):203-8. Epub 2006/03/17.
80. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim*. 2004;38(3):246-56. Epub 2004/06/23.
81. Sugiyama T, Okuno T, Fukuhara M, Oku H, Ikeda T, Obayashi H, et al. Angiotensin II receptor blocker inhibits abnormal accumulation of advanced glycation end products and retinal damage in a rat model of type 2 diabetes. *Exp Eye Res*. 2007;85(3):406-12. Epub 2007/08/07.

82. Praddaude F, Cousins SW, Pecher C, Marin-Castano ME. Angiotensin II-induced hypertension regulates AT1 receptor subtypes and extracellular matrix turnover in mouse retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 2009;89(1):109-18. Epub 2009/03/14.
83. Dornas WC, Oliveira TT, Augusto LE, Nagem TJ. Experimental atherosclerosis in rabbits. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(2):272-8. Epub 2010/09/22.
84. Damico FM. [Angiogenesis and retinal diseases]. *Arq Bras Oftalmol.* 2007;70(3):547-53. Epub 2007/09/05. Angiogenesis e doenças da retina.
85. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis.* 1989;9(6):895-907. Epub 1989/11/01.
86. Salazar JJ, Ramirez AI, de Hoz R, Rojas B, Ruiz E, Tejerina T, et al. Alterations in the choroid in hypercholesterolemic rabbits: reversibility after normalization of cholesterol levels. *Exp Eye Res.* 2007;84(3):412-22. Epub 2006/12/21.
87. Kolodgie FD, Katocs AS, Jr., Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(12):1454-64. Epub 1996/12/01.
88. Helfenstein T, Fonseca FA, Ihara SS, Bottos JM, Moreira FT, Pott H, Jr., et al. Impaired glucose tolerance plus hyperlipidaemia induced by diet promotes retina microaneurysms in New Zealand rabbits. *Int J Exp Pathol.* 2011;92(1):40-9. Epub 2011/01/29.
89. Johnstone MT, Perez AS, Nasser I, Stewart R, Vaidya A, Al Ammary F, et al. Angiotensin receptor blockade with candesartan attenuates atherosclerosis, plaque disruption, and macrophage accumulation within the plaque in a rabbit model. *Circulation.* 2004;110(14):2060-5. Epub 2004/09/29.
90. Yin W, Yuan Z, Wang Z, Yang B, Yang Y. A diet high in saturated fat and sucrose alters glucoregulation and induces aortic fatty streaks in New Zealand White rabbits. *Int J Exp Diabetes Res.* 2002;3(3):179-84. Epub 2002/12/03.
91. Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(5):627-36. Epub 2007/01/16.

92. Schmidt-Erfurth U, Rudolf M, Funk M, Hofmann-Rummelt C, Franz-Haas NS, Aherrahrou Z, et al. Ultrastructural changes in a murine model of graded Bruch membrane lipoidal degeneration and corresponding VEGF164 detection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(1):390-8. Epub 2008/01/04.
93. Duncan JL. Mouse models may provide new insight into the relation between cholesterol and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(12):1549-51. Epub 2005/11/22.
94. Zheng L, Gong B, Hatala DA, Kern TS. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(1):361-7. Epub 2007/01/02.
95. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(6):622-47. Epub 2008/10/23.
96. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(3):1126-41. Epub 2006/03/01.
97. Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Muramatsu M, Ishii K, Kirimura K, et al. Comparative effects of candesartan and amlodipine in a monkey atherosclerotic model. *Hypertens Res*. 2004;27(7):517-22. Epub 2004/08/11.

NORMAS ADOTADAS

Normas Adotadas

Normativa de Vancouver: Uniform Requirements for manuscript submitted to Biomedical Journals Editors(www.icmje.org).

Richardt NF, ZenereC, Lopes A. Normatização de trabalhos técnico-científicos: trabalhos acadêmicos, monografias de graduação, monografias de pós-graduação, dissertações e teses. Sistema Integrado de Bibliotecas, Biblioteca Central, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2007.

1. Base de Dados Consultadas

BIREME – Biblioteca Virtual em Saúde – Organização Panamericana da Saúde.

Portal da CAPES – Portal Brasileiro da Informação Científica – Ministério da Educação do Brasil.

Pubmed – United States National Library of Medicine – National Institute of Health.

2. Foram adotados os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1997), NominaAnatômica Veterinária e pela Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). As normas de redação adotadas foram as de trabalhos científicos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, dirigida para teses de Mestrado.

Anexos

Anexo 1 – Parecer de Protocolo de Pesquisa



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 08 de dezembro de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 678 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação Histomorfométrica e Imunohistoquímica Esclerionoretiniana em Coelhos Hipercolesterolêmicos Tratados com Candesartan

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dalton Bertolim Précoma

EQUIPE DE PESQUISA:

Dalton Bertolim Précoma, Rogil José de Almeida Torres, Conrado Roberto Hoffmann Filho

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelhos				

OBS: As peças anatômicas (globos oculares) utilizadas neste Projeto foram coletadas e conservadas durante o Projeto de Parecer nº 284 submetido e aprovado por este Comitê.

O colegiado do CEUA em reunião no dia 08/12/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

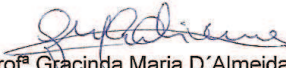
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Profª Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais

