

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de fármacia  
Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas

**Raquel Gregorio Arribada**

**INVESTIGAÇÃO DA LEUCUROLISINA-A APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTREA  
EM RATOS COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DAS  
OCLUSÕES DE VEIA DA RETINA**

Belo Horizonte

2022

Raquel Gregorio Arribada

**INVESTIGAÇÃO DA LEUCUROLISINA-A APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTREA  
EM RATOS COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DAS  
OCLUSÕES DE VEIA DA RETINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Belo Horizonte

2022

A775i Arribada, Raquel Gregório.  
Investigação da leucurolisina-a após administração intravítrea em ratos como potencial alternativa para o tratamento das oclusões de veia da retina [recurso eletrônico] / Raquel Gregório Arribada. – 2022.  
1 recurso eletrônico (141 f. : il.) : pdf

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.  
Coorientador: André Luís Branco de Barros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Retina – Vasos sanguíneos – Teses. 2. Veneno de cobra – Teses. 3. Ratos – Teses. 4. Metaloproteinases – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Barros, André Luís Branco de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 617.713

Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

*“INVESTIGAÇÃO DA LEUCUROLISINA-A APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTREA EM RATOS COMO  
POTENCIAL ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DAS OCLUSÕES DE VEIA DA RETINA”*

**RAQUEL GREGÓRIO ARRIBADA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Comissão

Dra. Clara Guerra Duarte  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Rodrigo Jorge  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP - USP

Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares  
Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Dra. Carolina Nunes da Silva  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. André Luís Branco de Barros - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior, Membro**, em 19/12/2022, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Branco de Barros, Professor do Magistério Superior**, em 19/12/2022, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Nunes da Silva, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 19:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clara Guerra Duarte, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 22:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cristian Ferreira Soares, Usuário Externo**, em 21/12/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Jorge, Usuário Externo**, em 30/01/2023, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1957157** e o código CRC **A2BE0FFE**.

## COLABORADORES

Dra. Sílvia Ligório Fialho – Serviço de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico – Fundação Ezequiel Dias (FUNED) – Belo Horizonte/MG.

Dr. Eládio Sanchez – Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais – FUNED – Belo Horizonte/MG.

Dra. Francine Behar-Cohen - laboratório de *Physiopathologie des maladies oculaires: innovations thérapeutiques* – Centre de Recherche des Cordeliers – INSERM – Paris/França.

Dra. Mayara Rodrigues Brandão de Paiva – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Faculdade de Farmácia – UFMG – Belo Horizonte/MG.

Ms. Nara Caroline Pereira – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Faculdade de Farmácia – UFMG – Belo Horizonte/MG.

Dra. Luciana Souza de Oliveira - Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais – FUNED – Belo Horizonte/MG.

Ms. Valéria Gonçalves de Alvarenga - Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais – FUNED – Belo Horizonte/MG.

Dra. Marianne Berdugo - laboratório de *Physiopathologie des maladies oculaires: innovations thérapeutiques* – Centre de Recherche des Cordeliers – INSERM – Paris/França.

Ms. Kimberlay Delaunay - laboratório de *Physiopathologie des maladies oculaires: innovations thérapeutiques* – Centre de Recherche des Cordeliers – INSERM – Paris/França.

Marie-Christine Naud - laboratório de *Physiopathologie des maladies oculaires: innovations thérapeutiques* – Centre de Recherche des Cordeliers – INSERM – Paris/França.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Espiritualidade, que me mantém segura, firme e intuitiva.

Ao professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, por toda troca e confiança ao longo de tantos anos. Sua orientação me deu muito além de conhecimento, me fez pesquisadora, crítica e responsável. Obrigada por ter me proporcionado uma das melhores experiências da minha vida por meio da ciência.

Ao professor Dr. André Luís Branco de Barros, por todo esse caminho de parceria. Obrigada pelo suporte de sempre e por me ensinar a enxergar a ciência de forma mais prática; sua orientação foi essencial na minha construção.

À Dra. Sílvia, por toda colaboração no dia a dia para a realização desse trabalho e na minha formação. Obrigada por me ensinar e por me ouvir não como aluna, mas como pesquisadora.

Ao Dr. Eládio Sanchez, pela disponibilização do seu laboratório e do meu principal objeto de pesquisa na tese.

Aos colegas de laboratório, que, durante esses anos, me ensinaram que não fazemos pesquisa sozinhos. Ter colegas para quem poder pedir ajuda e com quem tomar um café é de uma preciosidade tão grande, que só um laboratório vazio provocado pela pandemia pôde mostrar. Brenda, Carol, Cibele, Cleildo, Eliza, Grazi, Lays, Lutiana, Marcela, Mayara, Nayara, Oliver, Pedro, Thomas e Vinícius, vocês foram alegria nos meus dias.

À CAPES, pela concessão das bolsas de estudo no Brasil e no período de doutorado sanduíche.

À professora Lirlândia, pela colaboração e disponibilização do seu laboratório. Aos colegas de trabalho, professores e funcionários do PFA pela colaboração e ajuda de todos os dias, especialmente ao Marton, Batista e Ney.

À professora Dra. Francine Behar-Cohen, por ter me dado a oportunidade de aprender e crescer tanto com nossa colaboração dentro do seu laboratório. À toda *Équipe 17*, que contribuiu para que eu me sentisse acolhida e realizada em Paris.

Aos colegas e colaboradores da FUNED, pela ajuda e paciência com os experimentos. À Dra. Luciana Souza e Ms. Valéria Gonçalves pela orientação, à Lígia, Lara e Gustavo pelas contribuições, e ao Dr. Lucas e Dário pela grande experiência com a manipulação dos meus animais no biotério.

À Vânia, com quem percorro livros e poesias para sempre me encontrar.

À Amora e Lila, pela companhia fiel e amorosa durante os dias intermináveis de escrita dessa tese no meu quarto.

À minha família, amigos e amigas. Vocês me preenchem com amor, companheirismo e incentivo; obrigada pela compreensão e por serem meus abraços. A caminhada só continua enquanto vocês estiverem nela.

Aos meus irmãos, Alexandre e Guilherme, vocês são a minha maior joia. A nossa cumplicidade me fortalece e colore a minha vida. Obrigada por serem meu maior orgulho e me fazerem o de vocês!

Aos meus pais, Vera e Maurício, que abdicaram de tanto para que eu pudesse trilhar esse e outros caminhos. Vocês são a fonte de vida em mim. Obrigada por me vestirem com perseverança, compromisso e otimismo para construir meus sonhos.

Pai, obrigada por me ensinar que todos temos nossas batalhas, mas que seguimos juntos e com amor, e é isso que importa!

Mãe, você é a minha raiz. Obrigada por me nutrir com o seu amor, apoio e vibração, que me moldam e me mantêm forte. Você é minha luz!

Mãe, pai, Lê e Gui, a vocês.

*“E eu que digo isso: por que escrevo este livro? Porque o reconheço  
imperfeito.*

*Calado, seria a perfeição; escrito, imperfeioa-se. Por isso escrevo.*

*Só temos a certeza de escrever mal quando escrevemos.*

*A única obra grande e perfeita é aquela que se sonha em realizar”.*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

As oclusões de veias da retina são caracterizadas por uma obstrução vascular trombótica, sendo uma causa importante de cegueira no mundo. O tratamento dessa condição ainda é bastante desafiador devido ao acesso restrito dos fármacos ao segmento posterior do olho, causado por barreiras anatômicas e fisiológicas destinadas a manter os tecidos oculares isolados da circulação sistêmica. Assim, intervenções invasivas, como a injeção intravítrea, são necessárias para que fármacos atinjam concentrações terapêuticas na retina. Diversas substâncias com potencial trombolítico vêm sendo estudadas e empregadas na dissolução de trombos, de modo que, neste trabalho, buscou-se avaliar a leucorolisina-a (leuc-a), uma metaloproteinase não hemorrágica, purificada da peçonha da serpente *Bothrops leucurus*, que apresenta atividade fibrinolítica já descrita. Nesse contexto, teve-se por objetivo com a realização deste trabalho investigar a toxicidade e a segurança da leuc-a *in vitro* e *in vivo*, por meio de diferentes exames clínicos e modelos animais. Ainda, foi avaliada a depuração da leuc-a após a sua injeção intravítrea em olhos de ratos saudáveis e o potencial de degradação dos componentes da Matrigel pela leuc-a. O estudo de viabilidade celular indicou que nenhuma das concentrações testadas apresentou viabilidade celular acima de 80% frente às células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19), atingindo uma IC<sub>50</sub> de 26,64 µg/mL. Nos estudos *in vivo* foram avaliadas as doses de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. A primeira etapa foi realizada em ratos Wistar saudáveis e avaliada pelo exame de eletrorretinografia; nela, apenas a dose mais alta provocou alteração na atividade funcional da retina. As imagens cintilográficas obtidas após a radiomarcagem da leuc-a com o tecnécio-99m mostraram que a depuração dessa proteína na cavidade vítrea ocorreu de forma lenta, permanecendo constante por até 6 h. Contudo, na segunda etapa, também em ratos Wistar saudáveis, os exames de tomografia de coerência óptica e angiografia revelaram que todas as doses testadas apresentaram algum grau de toxicidade, incluindo eventos hemorrágicos. Esse resultado foi corroborado pela terceira etapa, que avaliou os efeitos da maior dose em ratos Long Evans saudáveis e deu indícios de alterações vasculares e recrutamento de células inflamatórias pelas análises de imuno-histoquímica. A degradação da laminina e do nidogênio, componentes da Matrigel e das membranas basais, pela leuc-a, pode explicar os eventos hemorrágicos

observados anteriormente. Esse estudo apresentou resultados controversos quanto à segurança da leuc-a para uso intravítreo e ao seu potencial hemorrágico, de modo que ela não foi diretamente testada em um modelo de oclusão de veia de retina. No entanto, este trabalho fornece resultados clínicos de grande relevância para os estudos de toxicidade ocular, bem como para melhor elucidação do comportamento da leuc-a *in vivo* e posteriores aplicações.

Palavras-chave: oclusão de veia da retina; metaloproteinases de venenos de serpentes; leuc-a.

## ABSTRACT

Retinal vein occlusion is characterized by a thrombotic vascular obstruction and is an important cause of blindness worldwide. The treatment of this condition is still very challenging due to restricted drug access to the posterior segment of the eye, caused by anatomical and physiological barriers designed to keep the ocular tissues isolated from the systemic circulation. Thus, invasive interventions, such as intravitreal injection, are necessary for drugs to reach therapeutic concentrations in the retina. Several substances with thrombolytic potential have been studied and employed in the dissolution of thrombi, so that, in this work, we sought to evaluate leucurolysin-a (leuc-a), a non-hemorrhagic metalloproteinase, purified from the *Bothrops leucurus* snake venom, which has a fibrinolytic activity already described. In this context, the objective of this work was to investigate the toxicity and safety of leuc-a *in vitro* and *in vivo*, employing different clinical tests and animal models. In addition, the clearance of leuc-a after intravitreal injection into the eyes of healthy rats and the potential degradation of Matrigel components by leuc-a were evaluated. The cell viability study indicated that none of the tested concentrations showed cell viability above 80% against ARPE-19 cells, and for the IC<sub>50</sub> a concentration of 26.64 µg/mL was obtained. In the *in vivo* studies, doses of 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL were evaluated. The first step was performed in healthy Wistar rats and evaluated by electroretinography exam; in it, only the highest dose caused alteration in the functional activity of the retina. The scintigraphic images obtained after the radiolabeling of leuc-a with technetium-99m showed that the clearance of this protein in the vitreous cavity occurred slowly, remaining constant for up to 6 h. However, in the second step, also in healthy Wistar rats, optical coherence tomography and angiography revealed that all doses tested showed some degree of toxicity, including hemorrhagic events. This result was corroborated by the third step, which evaluated the effects of the highest dose of leuc-a in healthy Long Evans rats and gave evidence of vascular changes and recruitment of inflammatory cells by immunohistochemistry analyses. The degradation of laminin and nidogen, components of Matrigel and basement membranes, by leuc-a may explain the hemorrhagic events observed earlier. This study showed controversial results regarding the safety of leuc-a for intravitreal use and its hemorrhagic potential, so it was not directly tested in a retinal vein occlusion model. However, this work

provides clinical results of great relevance for ocular toxicity studies as well as for further elucidation of the behavior of leuc-a *in vivo* and in further applications.

Keywords: retinal vein occlusion; snake venom metalloproteinases; leuc-a.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema anatômico do bulbo ocular.....	25
Figura 2 - Camadas e estruturas celulares que compõem a retina.....	29
Figura 3 - Principais vias de administração oculares.....	31
Figura 4 - Principais componentes envolvidos na vascularização da retina.....	35
Figura 5 - Fundoscopias de (A) oclusão de veia retiniana central e (B) oclusão de veia retiniana ramificada.....	36
Figura 6 - Esquema representativo dos domínios das MPVSs e suas principais características.....	41
Figura 7 - Estrutura 3d da leuc-a.....	43
Figura 8 - Esquema da placa utilizada no estudo de viabilidade celular da leuc-a.....	49
Figura 9 - Curva da viabilidade celular em linhagem ARPE-19 após tratamento com leuc-a por 48 h.....	50
Figura 10 - Células da linhagem ARPE-19 coradas com SRB e fotografadas em aumento de 5 x, sendo (A) Controle – tratamento com meio de cultura; (B), (C), (D), (E), (F) e (G) e tratamentos por 48 h com leuc-a 12,5, 25, 50, 100, 200 e 500 µg/mL, respectivamente.....	51
Figura 11 - Protocolo experimental da avaliação da toxicidade e segurança <i>in vivo</i> da leuc-a em ratos Wistar pelo exame de eletrorretinografia.....	54
Figura 12 - Demonstração das injeções intravítreas nos olhos de ratos Wistar.....	56
Figura 13 - Exame de eletrorretinografia, indicando a Cúpula de Ganzfeld e o posicionamento do animal, dos eletrodos e da lente.....	57
Figura 14 - Imagens do fundo de olho de ratos Wistar nas doses de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL nos períodos pré injeção, 7 e 14 dias após as injeções intravítreas.....	60
Figura 15 - Variação da PIO dos ratos Wistar nas doses de 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL nos períodos pré injeção, 7 e 14 dias após as injeções intravítreas.....	61

Figura 16 - Respostas normais obtidas por meio do ERG sob condições escotópicas e fotópicas.....	63
Figura 17 - Respostas ERGs escotópicas de ratos albinos e humanos diferem em amplitude e tempo implícito.....	64
Figura 18 - Curva do eletrorretinograma (ERG) na condição escotópica (0,03 e 3,0 cd.s.m <sup>-2</sup> ), 7 e 14 dias após injeção intravítrea de diferentes doses de Leuc-a, sendo (A) veículo, (B) Leuc-a 12,5 µg/mL; (C) Leuc-a 25 µg/mL; (D) Leuc-a 50 µg/mL e (E) Leuc-a 100 µg/mL.....	65
Figura 19 - Medidas das amplitudes das ondas a e b nos <i>steps</i> 6 e 11 das diferentes doses testadas, sendo (A) a amplitude da onda a no <i>step</i> 11; (B) a amplitude da onda b no <i>step</i> 11 e (C) a razão a/b no <i>step</i> 11.....	67
Figura 20 - Curvas de amplitude das ondas a e b em razão do log da intensidade luminosa nas diferentes doses testadas, sendo (A) veículo; (B) Leuc-a 12.5 µg/mL; (C) Leuc-a 25 µg/mL; (D) Leuc-a 50 µg/mL e (E) Leuc-a 100 µg/mL.....	69
Figura 21 - Microscopia óptica de retina de rato corada por HE no tempo de 14 dias após a injeção intravítrea de (A) veículo; (B) Leuc-a 12,5 µg/mL; (C) Leuc-a 25 µg/mL; (D) Leuc-a 50 µg/mL; (E) Leuc-a 100 µg/mL.....	71
Figura 22 - Protocolo experimental da radiomarcagem da leuc-a com o tecnécio-99m e avaliação qualitativa da depuração do complexo <sup>99m</sup> Tc-leuc-a da cavidade vítrea.....	74
Figura 23 - Estabilidade <i>in vitro</i> do complexo <sup>99m</sup> Tc-Leuc-a em função do tempo na presença de salina, em temperatura ambiente.....	79
Figura 24 - Imagens cintilográficas obtidas nos tempos de (A) 0, (B) 1 h, (C) 2 h, (D) 4 h e (E) 6 h após a injeção intravítrea de <sup>99m</sup> Tc-Leuc-a em ratos Wistar.....	81
Figura 25 - Protocolo experimental da avaliação da toxicidade e segurança <i>in vivo</i> da leuc-a em ratos wistar pelos exames de tomografia de coerência óptica e angiografia...	83
Figura 26 - Adaptação do tomógrafo Heidelberg Engineering para uso animal.....	85
Figura 27 - Injeção intravenosa de uma solução a 10 % de fluoresceína, na cauda do rato para análise de angiografia.....	86
Figura 28 - Imagens do fundo de olho de ratos Wistar nas doses de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL nos períodos pré injeção, 7 e 14 dias após as injeções intravítreas.....	87

Figura 29 - Fotografia do fundo do olho de um rato Wistar saudável, utilizando o OCT, sendo (A) em cores e (B) em infravermelho.....	89
Figura 30 - Principais camadas de uma retina saudável evidenciadas em uma imagem de OCT da região macular.....	90
Figura 31 - Imagens de fundo de olho em (A) cores e em (B) infravermelho; (C) angiografia por fluoresceína e (D) e (E) OCT do olho de um rato Wistar controle.....	92
Figura 32 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (E) cores e em (B) e (F) infravermelho; (C) angiografia por fluoresceína e (D) e (G) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo um, 7 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	93
Figura 33 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) cores e em (B) e (D) infravermelho, e (C) e (E) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo um, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	94
Figura 34 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (F) cores e em (B) e (G) infravermelho; (C), (D), (H) e (I) angiografia, e (E) e (J) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo dois, 7 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	95
Figura 35 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) cores e em (B) infravermelho; (C) angiografia e (D) e (E) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo dois, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	96
Figura 36 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (G) cores e em (B) e (H) infravermelho; (C), (D) e (I) angiografia, e (E), (J) e (K) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo três, 7 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	97
Figura 37 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (G) cores e em (B) e (H) infravermelho; (C), (D) e (I) angiografia, e (E), (J) e (K) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo três, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	98
Figura 38 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (F) cores e em (B) e (G) infravermelho; (C), (D), (H) e (I) angiografia, e (E) e (J) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo quatro, 7 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	99
Figura 39 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (F) cores e em (B) e (G) infravermelho; (C), (D), (H) e (I) angiografia, e (E) e (J) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo quatro, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	100
Figura 40 - Microscopia óptica de retina de rato corada por HE no tempo de 14 dias após a injeção intravítrea de (A) veículo; (B) Leuc-a 12,5 µg/mL; (C) Leuc-a 25 µg/mL; (D) Leuc-a 50 µg/mL; (E) Leuc-a 100 µg/mL.....	101

Figura 41 - Protocolo experimental da avaliação da toxicidade da maior dose testada da leuc-a <i>in vivo</i> em ratos Long Evans pelos exames de OCT e angiografia.....	104
Figura 42 - Imagens representativas de (A) OCT e (B) e (C) angiografia do olho de um rato Long Evans controle.....	107
Figura 43 - Imagens representativas de (A) e (C) OCT e (B) e (D) angiografia dos olhos de ratos Long Evans, sete dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	108
Figura 44 - Imagens representativas das angiografias dos olhos de ratos Long Evans, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	109
Figura 45 - Imagens representativas de (A) e (C) OCT e (B) e (D) angiografia dos olhos de ratos Long Evans, 28 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.....	109
Figura 46 - Imagens representativas do ensaio de imuno-histoquímica em montagens planas da retina. As imagens (A), (D) e (G) correspondem ao grupo controle; as imagens (B), (E), (H), (C), (F) e (I) correspondem a animais do grupo tratado com a leuc-a. A cor roxa representa a marcação com o anticorpo para IBA-1; a cor vermelha representa a marcação com o anticorpo para NG-2; e a cor verde representa a marcação com o anticorpo para CD-31.....	112
Figura 47 - Protocolo experimental da avaliação hidrólise da matrigel pela leuc-a e análise por western blotting.....	115
Figura 48 - Avaliação da degradação dos componentes da Matrigel pela leuc-a por análise eletroforética.....	117
Figura 49 - Avaliação da hidrólise dos componentes da Matrigel, sendo (A) laminina, (B) nidogênio, pela leuc-a, por análise de western blotting.....	119
Figura 50 - Esquema geral contendo todas as etapas experimentais.....	121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variação das condições de radiomarcção da leuc-a para melhor controle da pureza radioquímica.....	78
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação dos grupos de estudo para avaliação da viabilidade celular da leuc-a.....	49
Quadro 2 – Relação dos grupos de estudo para avaliação da toxicidade e segurança da leuc-a após as administrações intravítreas.....	55
Quadro 3 – Relação dos anticorpos usados para avaliação das neurorretinas pela técnica de imuno-histoquímica.....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
CCD	Cromatografia em camada delgada
EPR	Epitélio pigmentado da retina
ERG	Eletrorretinografia
HE	Hematoxilina-eosina
HOVR	Oclusão de veia retiniana hemi-central
ISCEV	<i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>
Leuc-a	<i>Leucurolisina-a</i>
MPVS	Metaloproteinase de veneno de serpent
OMS	Ogranização Mundial da Saúde
OVR	Oclusão de veia da retina
OVRC	Oclusão de veia retiniana central
OVRR	Oclusão de veia retiniana ramificada
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PIO	Pressão intraocular
SRB	Sulfarrodamina B
UV	Ultravioleta
<sup>99m</sup> Tc	Tecnécio-99 metaestável

## LISTA DE NOTAÇÕES E SÍMBOLOS

%	Porcento
±	Mais ou menos
° C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µBq	Microbequerel
µCi	Microcurrie
cd.s.m <sup>-2</sup>	Candela por segundo por metro quadrado
g	Gramma
H	Hora
Hz	Hertz
KDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ms	Milissegundo
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio
p/v	Peso por volume
s	Segundo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	24
2.1	<b>A anatomia do olho humano</b>	24
2.1.1	<i>Segmento posterior</i>	26
2.1.1.1	Esclera	26
2.1.1.2	Coroide	26
2.1.1.3	Corpo vítreo	27
2.1.1.4	Nervo óptico	27
2.1.1.5	Retina	27
2.2	<b>Vias oftálmicas de administração de fármacos</b>	31
2.3	<b>Oclusões de veia da retina</b>	34
2.4	<b>Metaloproteinases de venenos de serpentes</b>	39
2.5	<b>Leucurolisina-a</b>	43
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	45
3.1	<b>Objetivo Geral</b>	45
3.2	<b>Objetivos Específicos</b>	45
<b>4</b>	<b>ETAPA EXPERIMENTAL 1: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTADO DA RETINA (ARPE-19) EXPOSTAS À LEUC-A</b>	46
4.1	<b>Materiais</b>	47
4.2	<b>Preparo das soluções de trabalho da leuc-a</b>	47
4.3	<b>Avaliação <i>in vitro</i> da leuc-a em células ARPE-19 pelo método da sulfarrodamina B</b>	48
4.4	<b>Resultados e discussão</b>	50
4.4.1	<i>Avaliação <i>in vitro</i> da leuc-a em células ARPE-19 pelo método da sulfarrodamina B</i>	50
<b>5</b>	<b>ETAPA EXPERIMENTAL 2: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E SEGURANÇA <i>IN VIVO</i> DA LEUC-A EM RATOS NÃO PIGMENTADOS WISTAR PELO EXAME DE ELETORRETINOGRRAFIA</b>	53
5.1	<b>Animais</b>	54
5.2	<b>Materiais</b>	54

5.3 Injeções intravítreas das soluções de leuc-a.....	55
5.4 Avaliação clínica .....	56
5.5 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma.....	57
5.6 Avaliação histológica.....	58
5.7 Resultados e discussão.....	59
5.7.1 Avaliação clínica.....	59
5.7.2 Estudo funcional da retina por ERG .....	62
5.7.3 Avaliação histológica.....	70
<b>6 ETAPA EXPERIMENTAL 3: RADIOMARCAÇÃO DA LEUC-A COM TECNÉCIO- 99M E AVALIAÇÃO DA DEPURAÇÃO DO COMPLEXO <sup>99m</sup>Tc-LEUC-A IN VIVO.</b>	<b>73</b>
6.1 Animais .....	74
6.2 Materiais.....	74
6.3 Radiomarcção da leuc-a e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade .....	75
6.4 Determinação da estabilidade de marcação da leuc-a em solução salina...	76
6.5 Avaliação qualitativa da depuração do complexo <sup>99m</sup> Tc-leuc-a após a administração intravítrea em olhos de ratos Wistar saudáveis .....	76
6.6 Resultados .....	77
6.6.1 Radiomarcção da leuc-a e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade .....	77
6.6.2 Determinação da estabilidade de marcação da leuc-a em solução salina .....	78
6.6.3 Avaliação qualitativa da depuração do complexo <sup>99m</sup> Tc-leuc-a após a administração intravítrea em olhos de ratos Wistar saudáveis.....	79
<b>7 ETAPA EXPERIMENTAL 4: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E SEGURANÇA IN VIVO DA LEUC-A EM RATOS NÃO PIGMENTADOS WISTAR PELOS EXAMES DE TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA E ANGIOGRAFIA .....</b>	<b>82</b>
7.1 Animais .....	83
7.2 Materiais.....	83
7.3 Injeções intravítreas das soluções de leuc-a.....	84
7.4 Avaliação clínica .....	84
7.5 Tomografia de coerência óptica e angiografia por fluoresceína .....	84
7.6 Avaliação histológica.....	86
7.7 Resultados e discussão.....	86

7.7.1 <i>Avaliação clínica</i> .....	86
7.7.2 <i>Fundo de olho, OCT e angiografia por fluoresceína</i> .....	88
7.7.3 <i>Avaliação histológica</i> .....	100
<b>8 ETAPA EXPERIMENTAL 5: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MAIOR DOSE TESTADA DA LEUC-A <i>IN VIVO</i> EM RATOS PIGMENTADOS LONG EVANS PELOS EXAMES DE OCT E ANGIOGRAFIA</b> .....	103
8.1 <b>Animais</b> .....	104
8.2 <b>Materiais</b> .....	105
8.3 <b>Injeções intravítreas das soluções de leuc-a</b> .....	105
8.4 <b>OCT e angiografia por fluoresceína e indocianina verde</b> .....	106
8.5 <b>Imunohistoquímica em montagens planas da retina</b> .....	106
8.6 <b>Resultados e discussão</b> .....	107
8.6.1 <i>OCT e angiografia por fluoresceína e indocianina verde</i> .....	107
8.6.2 <i>Imuno-histoquímica em montagens planas da retina</i> .....	110
<b>9 ETAPA EXPERIMENTAL 6: AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DA MATRIGEL PELA LEUC-A E ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING</b> .....	114
9.1 <b>Materiais</b> .....	115
9.2 <b>Avaliação da hidrólise dos componentes da Matrigel pela leuc-a</b> .....	115
9.3 <b>Western blotting</b> .....	116
9.4 <b>Resultados e discussão</b> .....	117
9.4.1 <i>Avaliação da hidrólise dos componentes da matrigel pela leuc-a</i> .....	117
9.4.2 <i>Western blotting</i> .....	118
<b>10 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	121
<b>11 CONCLUSÃO</b> .....	124
<b>12 PERSPECTIVAS</b> .....	125
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	126
<b>ANEXOS</b> .....	1388

## 1 INTRODUÇÃO

As oclusões de veia da retina constituem um tipo de doença vascular degenerativa que está relacionada à cegueira, sendo mais prevalente na população de meia idade e idosa (AWWAD et al., 2017b; HAYREH, 2014).

A principal intervenção terapêutica atual é composta pelos ativadores de plasminogênio tecidual, que convertem o plasminogênio em plasmina. No entanto, essa abordagem terapêutica traz riscos de hemorragia severos ao paciente, de modo que a busca por alternativas se faz necessária (HERMOGENES et al., 2006; THELWELL, 2014). Além disso, o tratamento das doenças no segmento posterior do olho é bastante desafiador, uma vez que as suas barreiras anatômicas dificultam o acesso de fármacos a alvos específicos e em concentrações terapêuticas (HUANG; CHEN; RUPENTHAL, 2018). Assim, vias alternativas de administração ocular, como as injeções intravítreas, são essenciais para contornar essas limitações.

Nesse contexto, venenos de animais peçonhentos vêm sendo investigados quanto à presença de compostos com propriedades terapêuticas potenciais para o tratamento de doenças, como as metaloproteinases de venenos de serpentes (MPVSs). As metaloproteinases são compostos biologicamente ativos que, dentre outras funções, atuam em mecanismos envolvidos na cascata de coagulação, agregação plaquetária e degradação dos componentes das membranas basais (DE SOUZA et al., 2016a).

Esses compostos também estão presentes no veneno da serpente *Bothrops leucurus*, uma espécie de jararaca responsável por altos índices de acidentes ofídicos no Brasil (DE MORAIS et al., 2013b). Verificou-se que dentre as metaloproteinases presentes nessa e em outras espécies, algumas eram capazes de provocar hemorragia, enquanto outras não. Assim, a partir da purificação do veneno de *Bothrops leucurus* foi identificada a leucurolisina-a, ou leuc-a, uma proteinase não hemorrágica da classe P-I das MPVSs com atividade fibrinolítica (FERREIRA et al., 2009a).

A leuc-a foi, então, sugerida como possível alternativa para o tratamento das oclusões de veia da retina devido à sua atividade fibrinolítica e não hemorrágica, o que traria eficácia no tratamento e maior segurança ao paciente.

Diante do exposto, teve-se por objetivo com o desenvolvimento deste trabalho investigar o comportamento da leuc-a após a sua administração intravítrea em olhos de ratos saudáveis, a fim de avaliar possíveis indícios de toxicidade retiniana e determinar doses seguras de trabalho.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A anatomia do olho humano

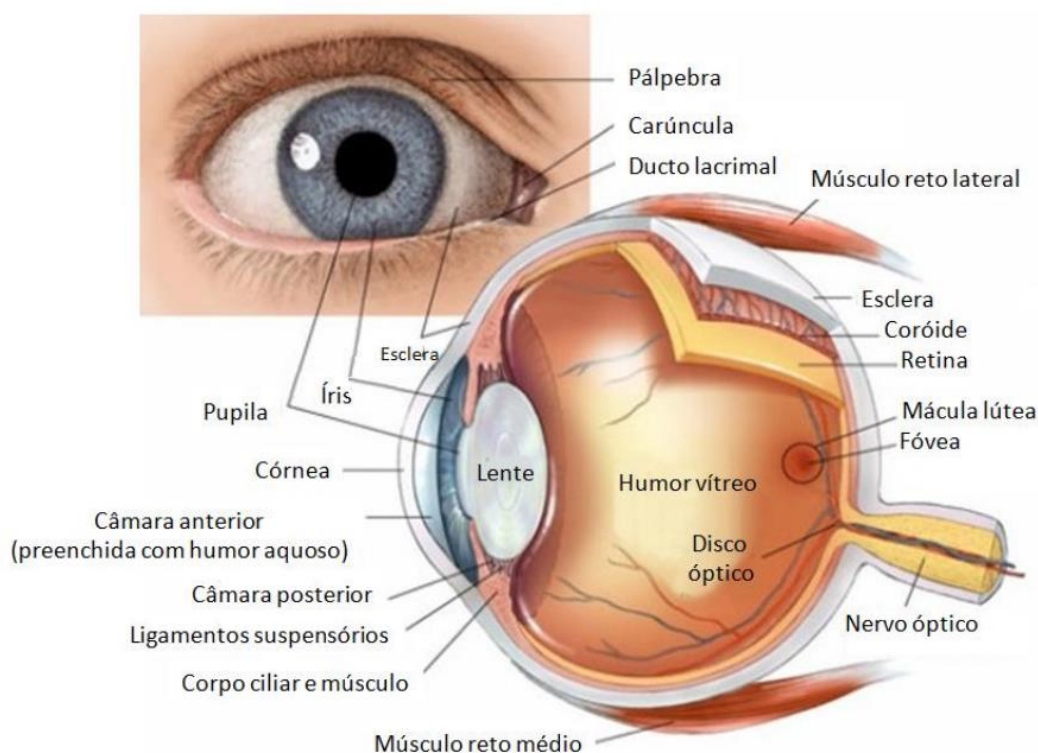
O olho é um órgão sensorial, altamente especializado em fotorrecepção, o processo pelo qual a luz do ambiente produz alterações em células nervosas especializadas da retina. Essas alterações resultam em potenciais de ação nervosos, que são, em seguida, transmitidos ao nervo óptico e ao cérebro, onde as informações são processadas e conscientemente apreciadas como visão (FORRESTER et al., 2016).

Cada tecido ocular apresenta uma estrutura distinta que desempenha funções específicas que possibilitam a percepção visual. Enquanto a porção anterior do olho é responsável por capturar e focar a luz, o segmento posterior é responsável por detectá-la e convertê-la em sinais elétricos que irão, posteriormente, formar uma imagem (KIM et al., 2014). De maneira geral, o segmento anterior corresponde a um terço do olho e engloba a córnea, esclera, íris, corpo ciliar e lente (também chamada de cristalino), e o segmento posterior corresponde aos dois terços restantes para o fundo do olho, sendo formado pelo corpo vítreo, esclera, coroide, retina e nervo óptico (JOSEPH, 2017). Essas estruturas são classificadas em três túnicas principais e concêntricas, sendo elas, de fora para dentro:

- túnica externa ou fibrosa, formada pela esclera, composta por tecido colágeno-elástico, e pela córnea, camada transparente anterior;
- túnica média ou vascular, chamada de úvea, que compreende a íris, o corpo ciliar e a coroide;
- túnica interna ou nervosa, formada pela retina, sendo o estrato neural e sensorial do olho (MAFEE et al., 2005).

As principais estruturas do olho estão representadas na **Figura 1**.

**Figura 1 – Esquema anatômico do bulbo ocular.**



**Fonte: Adaptado de VISION AND THE HEALTH EYE, 2018 (ACESSO EM 7/8/2022).**

O olho tem duas funções principais: permitir que a luz visível chegue à retina, ao mesmo tempo em que bloqueia outros comprimentos de onda nocivos (como a luz UV), além de formar a imagem nessa camada nervosa; e traduzir os fótons luminosos, por meio das células retinianas, em sinais elétricos que serão codificados, analisados e enviados a estruturas cerebrais superiores para permitir a visão. Ao longo desse percurso da luz até a retina, diferentes tecidos oculares e tipos celulares desempenham papéis importantes para o funcionamento desse órgão, como: manter a transparência da córnea e da lente, produzir e drenar o humor aquoso para manutenção da pressão intraocular, prover nutrientes para os tecidos avasculares, realizar a transdução visual pelos fotorreceptores e, ainda, reciclar o cromóforo do fotorreceptor da retina (GIBLIN et al., 2016).

Por fazer parte do sistema nervoso central, o olho é privado da circulação sistêmica pelas barreiras hemato-retiniana, hemato-aquosa e hemato-vítrea, como mecanismos de proteção dos tecidos oculares. Como consequência, o olho apresenta propriedades

farmacodinâmicas e farmacocinéticas particulares (GOODMAN & GILMAN, 2017), que irão impactar na abordagem terapêutica das diferentes desordens e doenças associadas a esse órgão.

Nessa revisão serão abordadas as estruturas do segmento posterior do olho, que representam o foco deste trabalho.

### *2.1.1 Segmento posterior*

#### *2.1.1.1 Esclera*

A esclera é uma camada fibrosa e opaca de tecido conectivo, conhecida como “branco do olho”, que protege o conteúdo intraocular e mantém o formato do globo ao permitir pequenas distensões e contrações frente a alterações da pressão intraocular (FORRESTER et al., 2016).

A opacidade dessa estrutura impede a transmissão de luz que poderia degradar as imagens formadas na retina, de modo que a sua geometria é regulada para focar a luz precisamente na retina. Além disso, os vasos sanguíneos da esclera auxiliam na irrigação e drenagem da coroide, do corpo ciliar, da íris e do nervo óptico (GOODMAN & GILMAN, 2017).

#### *2.1.1.2 Coroide*

A coroide é um tecido colagenoso e vascular situado na parte interna da esclera, responsável, principalmente, pelo aporte de oxigênio e nutrientes à retina externa. Além disso, ela também atua na termorregulação, secreta fatores de crescimento e possibilita ajustes da posição da retina, sendo mais espessa na região posterior e gradualmente mais fina à medida que avança à região anterior. Entre a rede de capilares da coroide e a retina externa encontra-se a membrana de Bruch, uma lâmina de tecido elástico e fibras colágenas (GOODMAN & GILMAN, 2017; NICKLA; WALLMAN, 2010).

### 2.1.1.3 Corpo vítreo

Aproximadamente 80 % do volume do olho corresponde à cavidade vítrea, que se situa entre a lente e a retina, e é preenchida pelo humor vítreo, um fluido gelatinoso e transparente. Esse fluido contém, em sua maioria, colágeno tipo II, ácido hialurônico e proteoglicanos, sendo secretado pelo corpo ciliar (FORRESTER et al., 2016; GOODMAN & GILMAN, 2017).

O humor vítreo auxilia no desenvolvimento do epitélio pigmentado da retina (EPR), protege as estruturas do olho de choques mecânicos, funciona como uma barreira a substâncias bioquímicas e, por ser transparente, permite que até 90 % da luz visível alcance a retina (YADAV et al., 2021).

### 2.1.1.4 Nervo óptico

O nervo óptico é um nervo mielinizado que pode ser dividido em quatro seções: intraocular, orbital, intracanalicular e intracranial. A formação do nervo se dá pela convergência dos axônios das células ganglionares no disco óptico, a partir do qual os axônios se expandem através da órbita ocular, chegando ao cérebro (FORRESTER et al., 2016; GOODMAN & GILMAN, 2017).

Aproximadamente 38 % de todos os axônios que entram e saem do sistema nervoso central são do nervo óptico, condição responsável pelo sistema visual altamente especializado e desenvolvido dos humanos (SELHORST; CHEN, 2009).

### 2.1.1.5 Retina

A retina é uma estrutura fina e transparente formada por neurônios altamente organizados, células da glia e vasos sanguíneos, sendo externamente ligada à membrana de Bruch e internamente ao vítreo. Tal estrutura é a responsável pela captação dos estímulos luminosos por meio de células fotossensíveis, que irão processar e traduzir os sinais em impulsos elétricos para o cérebro, onde as imagens

serão formadas (KOLB et al., 2001; TSAI et al., 2018a). Diz-se que a estrutura da retina reflete o seu funcionamento complexo e sua especialização topográfica extraordinária (BEHAR-COHEN et al., 2020).

A retina consiste em duas camadas principais: a retina neurosensorial e o epitélio pigmentado da retina (EPR). O EPR forma uma camada única de células na porção mais externa da retina e funciona como uma barreira hemato-retiniana, uma vez que as suas células são interligadas por junções estreitas que bloqueiam o processo de difusão, de modo que a maioria dos metabólitos necessita de transportadores para passar pelo EPR. No lado da retina, o EPR projeta as extremidades apicais, que se intercalam entre os segmentos externos e os fotorreceptores (HURLEY, 2021). O EPR apresenta, ainda, funções como adesão da camada neurosensorial, fagocitose de cones e bastonetes, absorção da luz e redução da refração da luz dentro do olho, aumentando a resolução das imagens formadas, e transporte e armazenamento de metabólitos e vitaminas, em especial a vitamina A (FORRESTER et al., 2016).

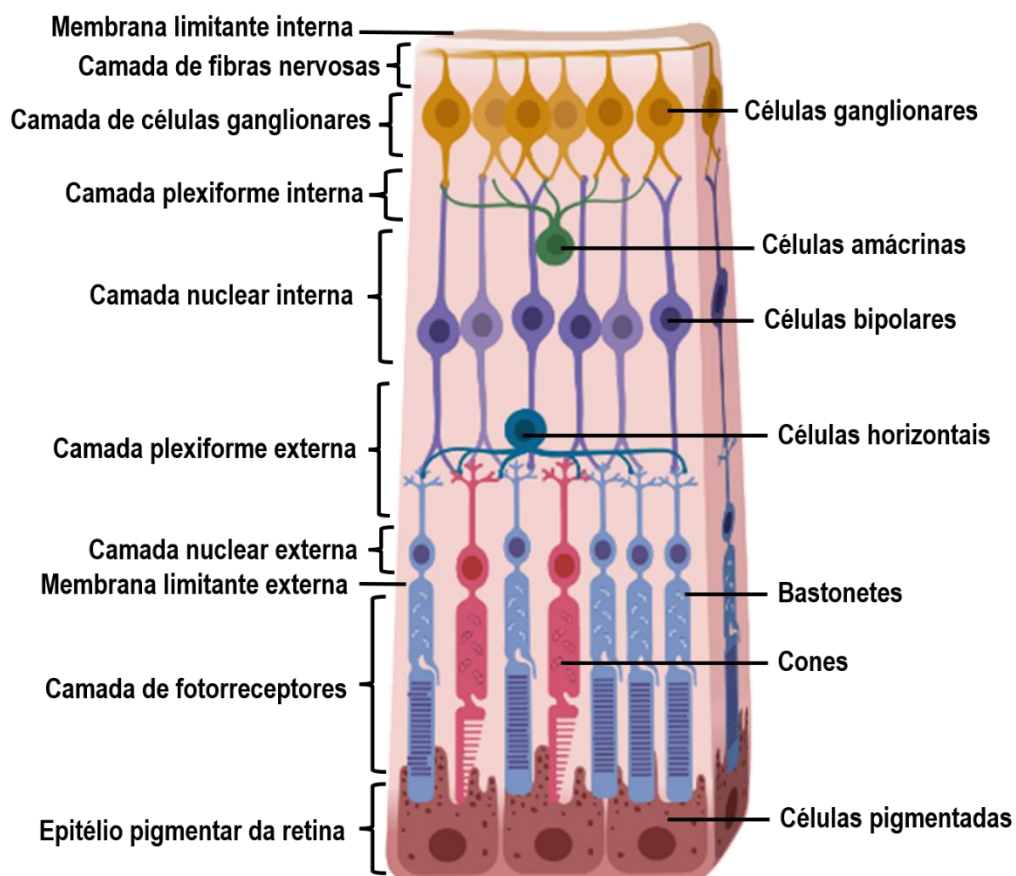
A circulação sistêmica é filtrada pelas barreiras hemato-retinianas interna e externa antes de alcançar a retina neurosensorial. Trata-se de um tecido estratificado, composto por seis tipos de células neurais: cones e bastonetes, que são fotorreceptores, células horizontais e amácrinas, que são neurônios de associação, células bipolares e ganglionares, que são neurônios de condução; e por três tipos de células da glia: as células de Müller, que são células de sustentação, os astrócitos e as micróglias, que são células de proteção. Essa porção neurosensorial da retina pode ser dividida nas seguintes camadas, começando pela mais interna e seguindo para a mais externa:

- membrana limitante externa, uma expansão membranosa que separa a retina do corpo vítreo;
- fibras nervosas, que constituem os axônios das células ganglionares, cercados por extensões gliais que formam o nervo óptico, conectado ao cérebro;
- células ganglionares, cujos axônios formam o nervo óptico;
- plexiforme interna, constituída pelos dendritos das células ganglionares e os axônios das células bipolares;
- plexiforme externa, formada pelas sinapses entre as células bipolares e os fotorreceptores e entre as células horizontais;

- nuclear externa;
- fotorreceptores (cones e bastonetes): os bastonetes detectam contraste, brilho e movimento e são responsáveis pela visão em preto-e-branco de baixa luminosidade, denominada condição escotópica, enquanto os cones são responsáveis por uma resolução mais fina e espacial e pela visão colorida, denominada condição fotópica;
- EPR (BEHAR-COHEN et al., 2020).

A organização em camadas da retina, desde a mais interna até a mais externa, está demonstrada na **Figura 2**.

**Figura 2 - Camadas e estruturas celulares que compõem a retina.**



Fonte: desenvolvido com BioRender.com.

Em síntese, os raios luminosos incidem pela córnea e a pupila do olho e chegam na câmara anterior, que é preenchida pelo humor aquoso. Esses raios passam, então,

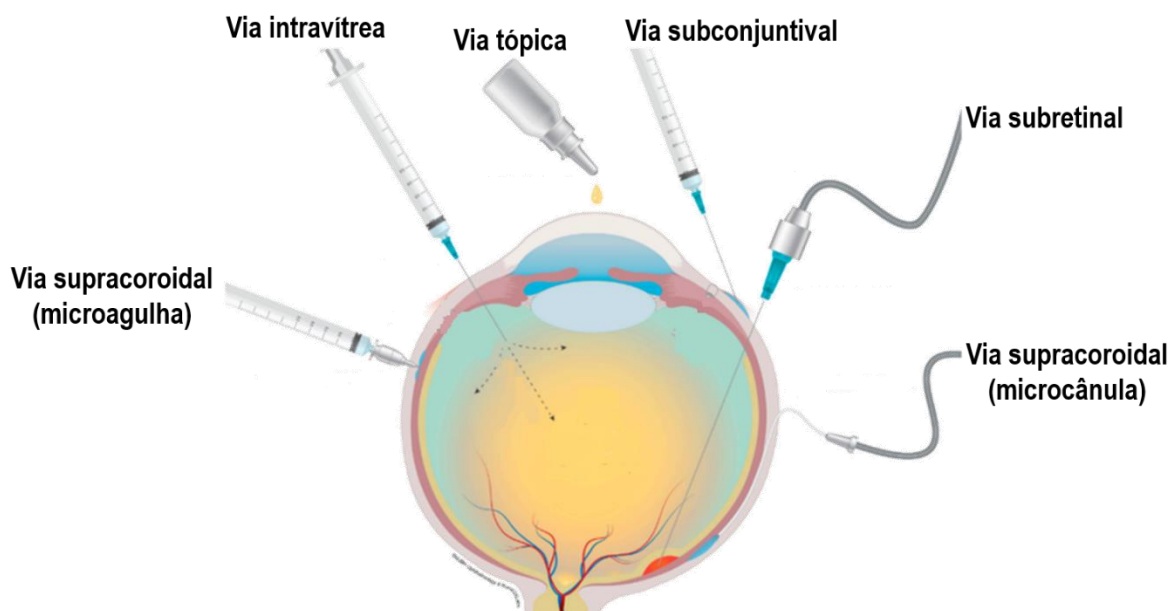
pelo cristalino, ou lente, que constitui a principal estrutura refrativa do olho, e são focalizados em direção à retina. É devido à lente que as imagens são formadas de forma invertida na retina, cabendo ao cérebro revertê-las posteriormente. Em seguida, os raios passam pela cavidade vítrea translúcida e atingem, finalmente, a retina neurossensorial. Uma vez na retina, os raios luminosos são absorvidos pelos fotorreceptores hiperpolarizados, sendo decompostos por duas substâncias químicas presentes nos cones e bastonetes: opsina, presente no primeiro, e rodopsina, presente no segundo. Esse processo, chamado de fototransdução, é responsável pela chegada do impulso elétrico no nervo óptico e pela consequente formação da imagem no nosso cérebro (KAPLAN, 2007; TSAI et al., 2018b).

Não é difícil concluir que a sofisticação da estrutura e dos processos fisiológicos que se passam nos olhos está relacionada com o alto grau de complexidade da formação da visão e com a necessidade de mecanismos eficientes de proteção do órgão. Assim, muitas barreiras anatômicas e fisiológicas são destinadas a manter a circulação sistêmica separada dos tecidos oculares, como a córnea e as barreiras do segmento anterior, mecanismos de depuração plasmática conjuntival, drenagem nasolacrimal, o complexo coroide-membrana de Bruch e a barreira hemato-retiniana. Dessa forma, a entrega de fármacos a alvos intraoculares específicos em concentrações terapêuticas é limitada, principalmente no que diz respeito aos tecidos do segmento posterior do olho, como é o caso da retina, de tal maneira que o tratamento de doenças que acometem essa região se torna um desafio (HUANG; CHEN; RUPENTHAL, 2017; LALU et al., 2017; TSAI et al., 2018a). Logo, a injeção de fármacos diretamente na cavidade vítrea apresenta-se como uma alternativa para atingir a concentração necessária no tecido retiniano (OGURA, 2001; PENHA et al., 2010; TSAI et al., 2018a).

## 2.2 Vias oftálmicas de administração de fármacos

Os sistemas convencionais de administração de fármacos para o tratamento das doenças oculares incluem vias não invasivas, como a tópica (colírios e pomadas) e oral (sistêmica), e vias invasivas, como as injeções intravítreas e perioculares (KIM; WOO, 2021), como ilustrado na **Figura 3**.

**Figura 3 – Principais vias de administração oculares.**



**Fonte:** adaptado de KIM; WOO, 2021.

A via tópica costuma ser a via de escolha, principalmente para o tratamento das doenças que acometem a câmara anterior, como a síndrome do olho seco, a catarata e as infecções na córnea (GOTE et al., 2019). Contudo, ainda que a administração tópica seja de fácil acesso, simples e segura, muitas vezes há uma baixa adesão dos pacientes ao tratamento, por serem necessárias instilações frequentes do colírio ou da pomada ao longo do dia. Além disso, algumas condições farmacocinéticas são desfavoráveis para um tratamento eficaz, uma vez que o próprio mecanismo de drenagem lacrimal pode reduzir substancialmente a concentração necessária do fármaco para o tratamento (QAMAR et al., 2019).

A via oral ou sistêmica, por outro lado, oferece maior conforto ao paciente por requerer um menor número de administrações, em comparação à via tópica, e por já ser uma via bastante comum para tratamentos de uma forma geral (KAUR; KAKKAR, 2014). Durante muito tempo essa foi a via de escolha para o tratamento das doenças que acometem o segmento posterior do olho, como glaucoma, degeneração macular relacionada à idade, retinite causada por citomegalovírus, uveíte posterior, retinopatia diabética, retinite pigmentosa e as oclusões de veia da retina (AWWAD et al., 2017a).

No entanto, além das barreiras anatômicas e fisiológicas do olho já mencionadas, fármacos que são administrados por via oral sofrem metabolismo de primeira passagem no fígado, fazendo com que apenas 1 a 2 % da dose do fármaco alcance o segmento posterior do olho (KAUR; KAKKAR, 2014). Esses dois fatores resultam em uma baixa biodisponibilidade do fármaco, o que leva à necessidade da administração de doses elevadas, com consequente toxicidade e efeitos adversos ao paciente, tornando essa via ineficaz para o tratamento de tais doenças (ARRIBADA et al., 2022; FIALHO; CUNHA, 2007).

Com o intuito de superar essas questões e aumentar a biodisponibilidade dos fármacos nos sítios-alvo, diferentes estratégias, como as injeções intravítreas, injeções perioculares e aplicação de implantes intraoculares, têm sido empregadas para o tratamento das doenças do segmento posterior do olho. Essas estratégias promovem uma liberação sustentada do fármaco, o que prolonga a duração da terapia e, como consequência, reduz o número de intervenções no paciente (GABALLA et al., 2021).

As injeções perioculares referem-se àquelas realizadas nas áreas que circundam o globo ocular, promovendo a liberação local do fármaco em regiões adjacentes à esclera (GABALLA et al., 2021), referindo-se às vias subconjuntival, peribulbar, retrobulbar, subtenoniana e intracameral (AGRAHARI et al., 2016). Comparadas à injeção intravítrea, as injeções perioculares não oferecem uma disponibilidade tão alta do fármaco, embora sejam menos invasivas e possibilitem a chegada do fármaco no tecido-alvo por três vias: transescleral, circulação sistêmica pela coroide, e na camada anterior pelo filme lacrimal, córnea, humor aquoso e humor vítreo (GAUDANA et al., 2010b).

Embora as diferentes administrações perioculares sejam, de fato, menos invasivas, as injeções intravítreas continuam sendo bastante utilizadas para o tratamento das doenças vítreo-retinianas e da coroide por serem mais alvo-específicas (GAUDANA et al., 2010a; KOMPELLA et al., 2013). Tais injeções envolvem a administração direta do medicamento sob a forma de solução, suspensão ou até mesmo implantes (FIALHO et al., 2003), com o uso de uma agulha de até 30 gauge e aplicando, usualmente, um volume de 150 a 200  $\mu$ L no olho humano.

Após a injeção, o fármaco se distribui pela cavidade vítrea e penetra nos alvos extracelulares e intracelulares dos tecidos do segmento posterior do olho (DEL AMO et al., 2017). Apesar disso, a distribuição do fármaco no vítreo não é uniforme, de modo que moléculas menores tendem a se distribuir rapidamente, enquanto moléculas maiores levam mais tempo. O processo de distribuição do fármaco também depende das condições fisiopatológicas do olho e do peso molecular do fármaco injetado (GAUDANA et al., 2010a). Segundo Jagger e colaboradores (2004), as propriedades farmacocinéticas dos compostos no vítreo tendem a se alterarem em um cenário de inflamação ou infecção (JAGER et al., 2004).

A injeção intravítrea apresenta alguns riscos inerentes ao próprio procedimento, independente da substância que está sendo administrada, como:

- ansiedade pré-injeção;
- hemorragia subconjuntival e outras complicações hemorrágicas;
- aumento da pressão intraocular;
- percepções visuais, como partículas em órbita;
- dor durante e após o procedimento;
- refluxo logo após a injeção;
- endoftalmite (GUPTA; SUN; SILVA, 2018).

Ainda, existem outros efeitos adversos mais graves que estão associados a uma maior frequência de administrações intravítreas, como catarata, hemorragia e descolamento da retina (KOMPELLA et al., 2013).

É importante pontuar que antes de um composto ser devidamente aprovado para ser administrado por injeção intravítrea, é possível que ele possa apresentar

características prejudiciais ao ambiente natural do olho, como pH inadequado, excipientes impróprios ou, ainda, algum tipo de contaminação (JAGER et al., 2004).

### 2.3 Oclusões de veia da retina

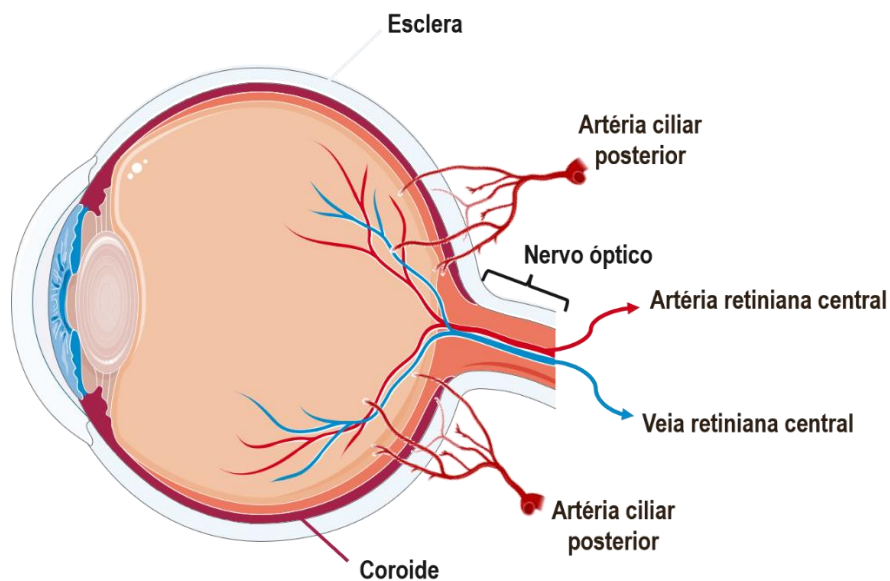
As doenças degenerativas da retina são a maior causa de cegueira no mundo e, para as quais, atualmente não há cura (PETIT; PUNZO, 2016). Associadas às doenças degenerativas estão, ainda, outras desordens retinianas que são igualmente prejudiciais à visão e constituem importante aspecto de saúde pública, como as obstruções vasculares da retina.

As oclusões de veias da retina (OVR) são um grupo heterogêneo de desordens crônicas que apresentam retorno venoso comprometido da circulação retiniana (IP; HENDRICK, 2018a). Esses distúrbios vasculares constituem uma importante causa de deficiência visual na população de meia idade e idosa e de cegueira definitiva, apesar de nenhuma faixa etária estar imune (AWWAD et al., 2017b; HAYREH, 2014).

O paciente acometido por uma OVR apresenta redução indolor e unilateral da visão central e do campo visual de gravidade variável. Inicialmente, os sintomas dependem, principalmente, da gravidade da lesão macular e da hemorragia retiniana e, mais tarde, das complicações do edema retiniano prolongado e isquemia, incluindo as neovascularizações secundárias (MACDONALD, 2014a).

A vascularização da retina é suprida pela artéria oftálmica, que é um ramo da artéria carótida interna. A artéria oftálmica passa ao longo do nervo óptico, sendo os seus ramos principais a artéria central da retina, que irriga a sua camada interna, e as artérias ciliares posteriores, que irrigam a coroide e a retina externa. Geralmente os pontos de oclusão correspondem a áreas onde a artéria e a veia compartilham uma bainha adventícia comum, isto é, na área da lâmina cribrosa ou nas áreas de cruzamento artéria-veia (CASTILLA-GUERRA; GÓMEZ ESCOBAR; GÓMEZ CERESO, 2021). A vascularização da retina pode ser observada na **Figura 4**.

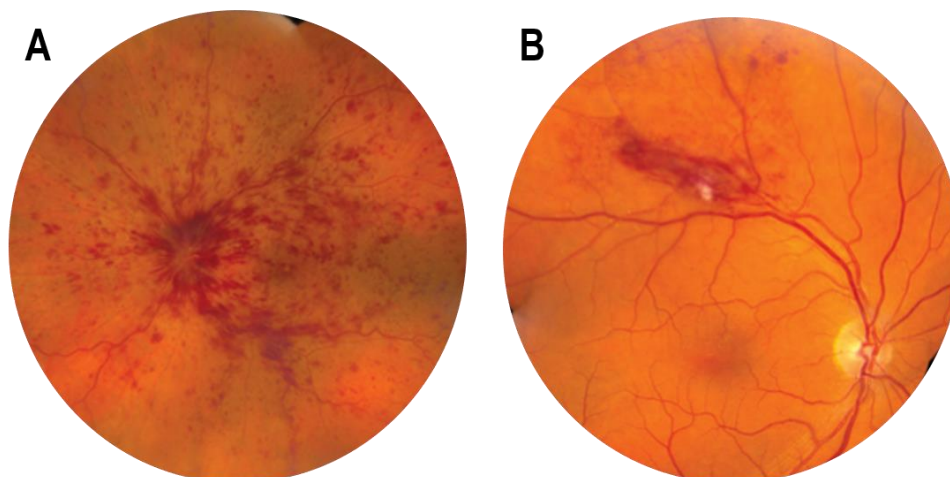
**Figura 4 – Principais componentes envolvidos na vascularização da retina.**



**Fonte:** adaptado de Servier Medical Art (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License).

Classicamente, as OVRs podem ser subdivididas em oclusão de veia retiniana ramificada (OVRR), que ocorre quando um ramo da veia central é obstruído, e em oclusão de veia retiniana central (OVRC), quando o fluxo de saída da veia central está prejudicado, sendo este o caso mais grave, uma vez que toda a retina é afetada (**Figura 5**) (CEHOFSKI; HONOR; VORUM, 2017).

**Figura 5 – Fundoscopias de (A) oclusão de veia retiniana central e (B) oclusão de veia retiniana ramificada.**



**Fonte: adaptado de (MACDONALD, 2014b).**

No entanto, hoje a classificação é um pouco mais específica, como exposto por Hayreh *et al.*, 2021:

- OVRC, podendo ser não isquêmica ou isquêmica;
- oclusão de veia retiniana hemi-central (OVRHC), podendo também ser não isquêmica ou isquêmica;
- e OVRR, sendo classificada como principal ou macular (HAYREH, 2021).

Cada um dos tipos de OVR está associado a um (ou vários) fator de risco, por exemplo, hipermetropia, aterosclerose e pressão sanguínea elevada são mais comuns na OVRR, enquanto o aumento da pressão intraocular é mais comum na OVRC. Essas particularidades demonstram que, apesar de virem de um grande grupo de doenças vasculares, os diferentes tipos de OVR apresentam diferentes prognósticos e tratamentos (REHAK; WIEDEMANN, 2010).

Embora a patogênese exata das OVR permaneça incerta, sabe-se que ela está relacionada à combinação de três alterações sistêmicas, conhecidas como a tríade de Virchow: alterações hemodinâmicas (estase venosa), alterações degenerativas da parede vascular e hipercoagulabilidade sanguínea (REHAK; WIEDEMANN, 2010).

A OVRC exacerba a estase venosa, aumenta a pressão intraluminal em até 24 vezes, estimula a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular e compromete a barreira hemato-retiniana interna. Isso leva à transudação de sangue e plasma das veias retinianas dilatadas e tortuosas, produzindo edema na cabeça do nervo óptico, hemorragia intrarretiniana e edema nos quatro quadrantes da retina, incluindo a mácula. O edema macular crônico, resultante das OVR provoca danos nas células da glia e do EPR, com consequente redução da drenagem do fluido retiniano. A isquemia costuma ser resultado tanto da inflamação quanto do aumento na pressão intersticial mediado pelo edema, que comprime fisicamente os capilares e compromete a perfusão. Tanto a HOVR quanto a OVRR produzem efeitos similares, mas, enquanto a HOVR acomete apenas um hemisfério do tecido, o aspecto retiniano da OVRR fica restrito ao setor drenado pelo vaso afetado, além de não provocar edema no nervo óptico (MACDONALD, 2014a).

O diagnóstico, assim como a diferenciação entre os tipos de OVR, conta com o uso de diferentes testes clínicos que, combinados, apresentam grande confiabilidade e segurança, sendo eles acuidade visual, campos visuais plotados com um perímetro de Goldmann, defeito pupilar aferente relativo, eletrorretinografia, oftalmoscopia e, principalmente, a angiografia de fundo de olho com fluoresceína (HAYREH, 2005).

Exames de rotina incluem a avaliação da pressão intraocular, exame com lâmpada de fenda e fundoscopia dilatada para detecção de glaucoma, neovascularização e/ou edema macular. A tomografia de coerência óptica (do inglês *Optical Coherence Tomography - OCT*) também é um exame bastante utilizado para confirmar a presença de edema macular e possibilita a avaliação quantitativa da espessura das camadas retinianas. Além disso, as imagens obtidas pela OCT fornecem informação adicional, como a presença de anormalidades na interface vítreo-retiniana, descolamentos neurosensoriais e/ou perda da integridade da retina exterior (IP; HENDRICK, 2018b).

Diferentes tratamentos das OVR foram realizados com o intuito de reestabelecer a circulação venosa normal, como, por exemplo, tentativas em realizar anastomoses (ligação entre veias) por meio de cirurgias e laser, aliviar a oclusão pela administração farmacológica de agentes trombolíticos e contornar o ponto de oclusão por *seathotomy* do nervo óptico. Contudo, a maior parte das limitações dessas estratégias resulta de complicações inerentes das próprias intervenções, levando a um cenário

atual em que a grande maioria dos tratamentos empregados é destinada às complicações decorrentes da OVR (IP; HENDRICK, 2018b), sendo os mais utilizados a fotocoagulação por laser, terapia anti-VEGF (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), implantes de esteroides e vitrectomia (JONAS; GLACET-BERNARD; COSCAS, 2017; KIDA, 2017; PIERRU et al., 2017).

A melhor intervenção, idealmente, seria a dissolução do trombo responsável pela OVR em um intervalo de tempo suficiente para minimizar as complicações posteriores. A dissolução de um trombo está diretamente relacionada ao processo bioquímico de degradação das redes de fibrina, chamado de fibrinólise (THELWELL, 2014). Nesse processo, o plasminogênio é convertido na sua forma ativa, a enzima plasmina, que, por sua vez, degrada a rede de fibrina presente no interior do trombo (HERMOGENES et al., 2006).

Os agentes farmacológicos que atuam nesse sistema e que são utilizados na clínica médica são derivados dos ativadores de plasminogênio tecidual (AP-t), de modo que a infusão intravenosa desses agentes é eficaz na restauração do fluxo sanguíneo em veias e artérias oclusas. No entanto, essa abordagem farmacológica apresenta baixa segurança para o paciente devido a uma janela terapêutica muito estreita, capaz de desencadear eventos hemorrágicos (THELWELL, 2014).

Diante do exposto, faz-se necessária a busca por alternativas igualmente eficazes na dissolução do trombo e restauração do fluxo sanguíneo nas veias retinianas, mas que apresentem maior segurança vascular. Uma estratégia bastante utilizada nesses casos é a procura por compostos que possuam propriedades e mecanismos de ação semelhantes, mas que até então não haviam sido testados para esse fim. Não raramente, esses compostos podem ser encontrados na natureza, sendo de origem vegetal ou animal, fruto da imensa biodiversidade que encontramos, principalmente, no nosso país. Não é recente, por exemplo, a descoberta de proteínas presentes no veneno de alguns animais peçonhentos (isto é, que apresentam aparelho inoculador do veneno), com propriedades terapêuticas, sendo potenciais tratamentos para diversas doenças. Nesse contexto, muitos pesquisadores vêm dedicando seu tempo no estudo de proteínas purificadas de venenos de serpentes com esse objetivo.

## 2.4 Metaloproteinases de venenos de serpentes

Mais de 220.000 espécies, aproximadamente 15 % de toda a diversidade animal no mundo, são venenosas, de modo que os venenos melhor caracterizados correspondem àqueles oriundos de caramujos cônicos, aranhas, escorpiões e serpentes (OLIVEIRA et al., 2022).

O gênero *Bothrops* é constituído de diversas espécies de serpentes distribuídas pelas Américas do Sul e Central, sendo todas elas peçonhentas. No Brasil, a espécie *Bothrops leucurus* (jararaca de cauda branca), responsável pelos maiores índices de envenenamento por picada de serpente, é encontrada nas regiões nordeste e sudeste, principalmente nos estados da Bahia e do Espírito Santo (DE MORAIS et al., 2013; GREMSKI et al., 2007).

Os venenos de serpentes são uma fonte rica de moléculas bioquimicamente ativas, cujas propriedades despertaram a curiosidade de pesquisadores, que buscaram entender a ação sistêmica desses compostos a fim de chegar a uma possível aplicação farmacêutica (GOMES et al., 2011; KOHLHOFF et al., 2012).

Em meados dos anos 1800, pesquisadores apontaram os primeiros indícios da atividade proteolítica dos venenos de serpentes ao verificarem que o fibrinogênio presente no sangue animal perdia a sua capacidade de induzir a coagulação após exposição ao veneno da serpente cascavel. Anos mais tarde, em 1960, houve provavelmente o primeiro relato do isolamento de proteinases que foram inativadas por EDTA e que foram posteriormente reconhecidas como metaloproteinases de venenos de serpentes (MPVSS) (MARKLAND; SWENSON, 2013).

Uma grande quantidade de proteínas e peptídeos biologicamente ativos fazem parte da composição dos venenos ofídicos, sendo que eles perturbam processos fisiológicos e bioquímicos normais e causam lesões locais e sistêmicas como dor, edema, hemorragia, necrose tecidual e desordens na coagulação sanguínea. As principais proteínas com atividade enzimática encontradas nos venenos são as fosfolipases A<sub>2</sub>, as proteases de serina, os peptídeos de três dedos e as metaloproteinases (SOFYANTORO et al., 2022). Dentre esses compostos, as metaloproteinases representam a classe principal de toxinas como alvo de

desenvolvimento terapêutico. A purificação e caracterização dessas substâncias demonstraram um papel importante associado ao sistema vascular, especialmente aos mecanismos que coordenam a cascata de coagulação e as funções plaquetárias (DE SOUZA et al., 2016; GOMES et al., 2011; HIGUCHI et al., 2011).

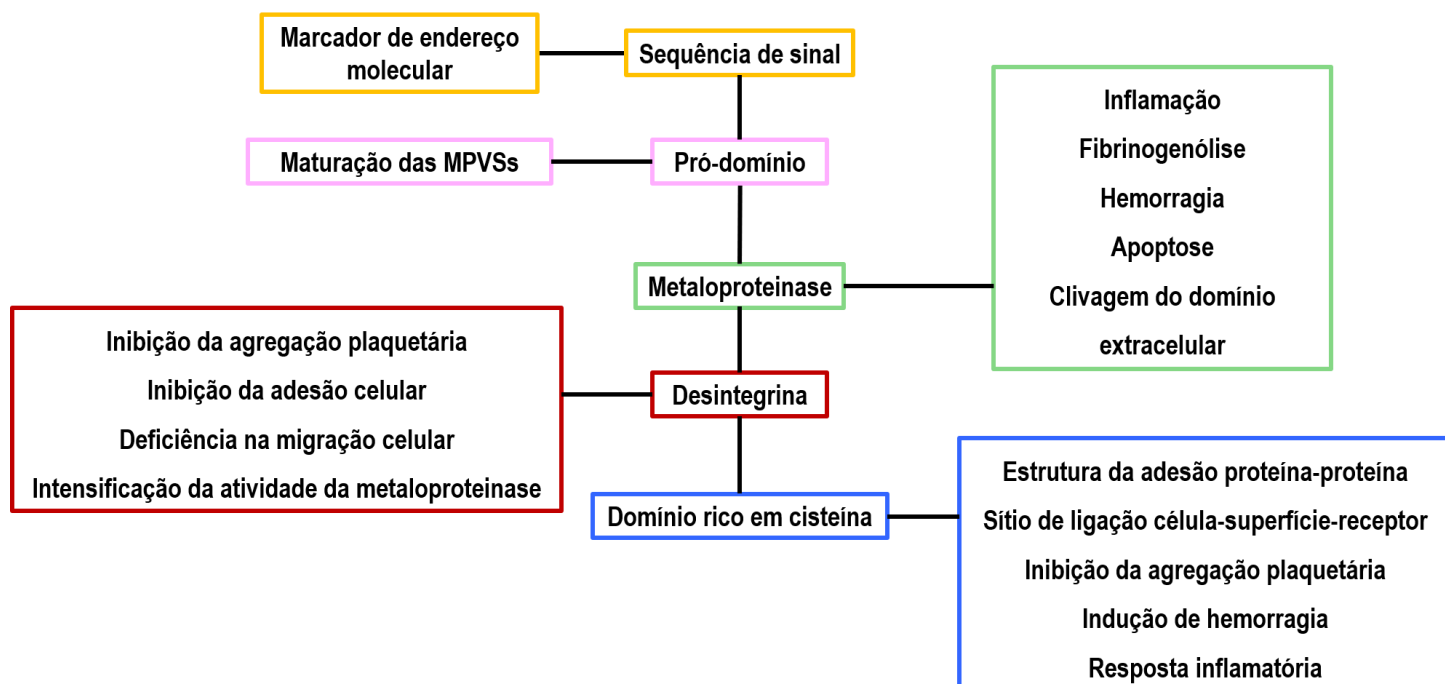
De maneira geral, as metaloproteinases são metaloproteínas de matriz, ou endopeptidases, que contêm íons cálcio na sua composição e são dependentes de zinco para serem fisiologicamente ativas (KANDHWAL et al., 2022; MARKLAND; SWENSON, 2013). Tanto as MPVSs quanto as metaloproteinases endógenas estão envolvidas na degradação dos constituintes proteicos da matriz extracelular (FISCHER; RIEDL, 2021; LI et al., 2022).

As MPVSs constituem, aproximadamente, de 11 a 65 % do total de proteínas com atividade enzimática presentes nos venenos da família Viperidae (víboras) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007). Essas proteínas são resultado de mecanismos evolucionários desenvolvidos para a adaptação das serpentes a diferentes ambientes, sendo substâncias capazes de agir em funções fisiológicas vitais em presas e predadores, por meio da interação com diferentes alvos relacionados à homeostase (MOURA-DA-SILVA et al., 2016).

As MPVSs são proteases zinco-dependentes, divididas em classes de acordo com a composição do seu domínio na forma madura da proteína. As MPVSs da classe P-I apresentam apenas um domínio catalítico, enquanto aquelas da classe P-II apresentam, além do domínio catalítico, um segundo domínio que pode gerar desintegrinas ao ser clivado; as MPVSs da classe P-III apresentam não só os dois domínios já citados, como também um outro domínio rico em cisteína (ESCALANTE et al., 2011); já as MPVSs da classe P-IV diferem das P-III por possuírem um domínio do tipo lecitina (FERREIRA et al., 2009).

A partir dessa classificação das MPVSs, tornou-se possível prever o potencial hemorrágico dessas proteínas, uma vez que se observou que a capacidade de induzir hemorragia está diretamente ligada à presença de domínios extras; isso significa, portanto, que as MPVSs das classes P-II, P-III e P-IV são potencialmente mais hemorrágicas que aquelas da classe P-I (ESCALANTE et al., 2011). Os domínios das MPVSs e suas principais características estão apresentados na **Figura 6**.

Figura 6 – Esquema representativo dos domínios das MPVSs e suas principais características.



Fonte: adaptado de (OLAOPA et al., 2020).

Os efeitos locais e sistêmicos que se sucedem à inoculação do veneno são consequência da ação sinérgica das metaloproteinases sobre diferentes segmentos da coagulação sanguínea, de modo que esses componentes podem atuar, por exemplo, como agentes fibrinolíticos, ativadores de protrombina (MARKLAND; SWENSON, 2013), ou ativadores dos fatores de coagulação X e II (MOURA-DASILVA et al., 2016). Como consequência, a atividade dessas substâncias em proteínas plasmáticas, tecidos conectivos, plaquetas e vasos sanguíneos (BERTHOLIM et al., 2021) produz danos que incluem necrose celular, hemólise, edema, inflamação, coagulopatia e hemorragia, que, se não forem rapidamente controlados, podem levar a óbito (WILLARD et al., 2021).

O processo hemorrágico ocorre quando a MPVS hidrolisa as proteínas da membrana basal, como a laminina, o colágeno IV e o nidogênio (PAES LEME et al., 2011), o que reduz a sua estabilidade mecânica e leva à sua ruptura (DE SOUZA et al., 2016). De modo geral, três fatores são importantes para esse processo: a ligação da proteína aos componentes da membrana basal dos capilares; o local em que ocorre essa ligação na membrana basal, que pode potencializar a hidrólise da própria membrana

e das proteínas celulares de sustentação; e, por fim, as forças hemodinâmicas da microcirculação que contribuem para a distensão e ruptura da parede capilar, com consequente hemorragia (FREITAS-DE-SOUSA et al., 2017). Assim, o mecanismo hemorrágico induzido pelas MPVSs pode não depender da degradação generalizada da matriz extracelular, mas sim da hidrólise de locais altamente específicos e pouco caracterizados da membrana basal responsáveis pela integridade vascular (GREMSKI et al., 2007).

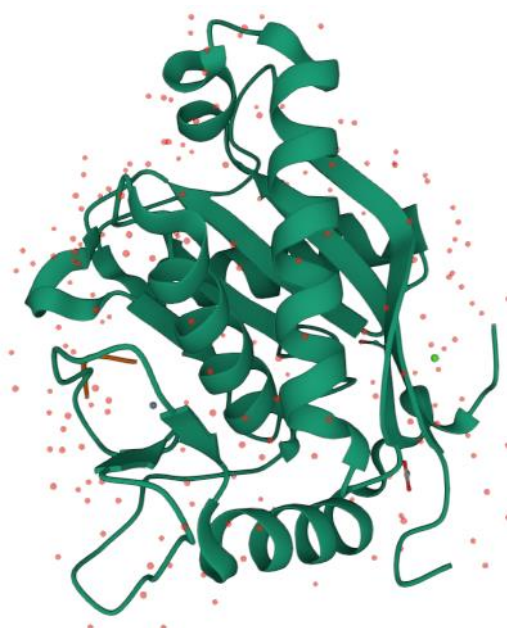
Diversos estudos tentaram determinar as diferenças estruturais e sequenciais entre as MPVSs que justificassem as diferentes capacidades hemorrágicas entre elas. Modelos de homologia molecular sugerem que a diferença eletrostática do ambiente ao redor do sítio ativo das MPVSs estaria envolvida nesse processo. Já as simulações de dinâmica molecular indicam que esse fenômeno pode ter relação com as diferenças de flexibilidade e rigidez em duas regiões da alça  $\Omega$ , situadas próximo ao domínio catalítico das MPVSs. Essa região próxima ao domínio catalítico, entre os resíduos 153 e 176 parece ser uma interface proteína-proteína crítica, capaz de influenciar a interação das MPVSs com as proteínas da matriz extracelular encontradas na membrana basal (DE SOUZA et al., 2016). Outros autores relatam, ainda, que as MPVSs P-II e P-III apresentam a mesma localização nos capilares e nas arteríolas que o colágeno tipo IV, enquanto as P-I estão mais espalhadas pelo tecido, de tal forma que essa diferença de localização também pode contribuir para a elevada atividade hemorrágica das P-II e P-III em comparação às P-I (OLAoba et al., 2020). Entretanto, apesar de todos os indícios apontados por esses estudos, ainda não há uma explicação definitiva sobre esse assunto.

Dentro da classe P-I, as MPVSs apresentam massa molecular entre 20 e 30 kDa e muita similaridade estrutural, mas com diferenças marcantes quanto à capacidade de induzir hemorragia. Segundo Freitas-de-Sousa e colaboradores (2017), a capacidade de uma MPVS em degradar componentes da membrana basal *in vitro* não implica que essa mesma atividade ocorra *in vivo*; contudo, muitos mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram completamente elucidados (FREITAS-DE-SOUSA et al., 2017).

## 2.5 Leucurolisina-a

Dentre as metaloproteinases não hemorrágicas purificadas do veneno de *B. leucurus* encontra-se a leucurolisina-a (leuc-a), uma  $\alpha$ -fibrinogenase de 23 kDa da classe P-I das MPVSSs, composta por 202 resíduos de aminoácidos, em uma única cadeia polipeptídica (**Figura 7**) (FERREIRA et al., 2009; GREMSKI et al., 2007).

Figura 7 – Estrutura 3D da leuc-a.



Fonte: protein data bank ([www.wwpdb.org](http://www.wwpdb.org) -acesso em 18/09/2022).

A leuc-a purificada atua diretamente sobre as cadeias alfa de fibrinogênio, fibrina e fibronectina plasmática, de maneira dose-dependente *in vitro*, o que resulta na sua capacidade de degradar coágulos de fibrina (BELLO et al., 2006; FERREIRA et al., 2009a; GREMSKI et al., 2007b). Esses componentes, dentre outros, como nidogênio, colágeno e laminina, são componentes da matriz extracelular e da membrana basal, sendo que a hidrólise desses componentes pelas metaloproteinases pode desencadear processos que perturbam a hemostasia (KARAMANOS et al., 2021; SOANS; NORDEN, 2021).

Os estudos com a leuc-a sugerem uma similaridade elevada de sequenciamento e conformação a uma outra MPVS não hemorrágica, também do tipo P-I, a mutalisina-II. Essa proteína, assim como a leuc-a, é uma  $\alpha$ -fibrinogenase cujas propriedades e atividades já são melhor elucidadas. Foi verificado, por exemplo, que a mutalisina-II induziu a recanalização de microvasos após um evento trombolítico nas orelhas de camundongos, de forma eficaz e segura, sem provocar sangramento (AGERO et al., 2007). Esse resultado, somado às similaridades sequencial e estrutural entre as duas proteínas, serviu como base para os estudos que se seguiram para avaliação das atividades fibrinolítica e trombolítica da leuc-a.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros de toxicidade e segurança *in vitro* e *in vivo* da leuc-a, administrada por via intravítrea em olhos de ratos saudáveis, como uma alternativa potencial para o tratamento das oclusões de veia da retina.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estudar a viabilidade celular de células do EPR (ARPE-19) expostas à leuc-a.
- Realizar a administração intravítrea da leuc-a em diferentes concentrações em olhos de ratos saudáveis e avaliar:
  - o estado clínico dos olhos, por meio de avaliações da pressão intraocular e fotografias do fundo do olho;
  - a atividade funcional da retina pelo exame de eletrorretinograma;
  - o aspecto dos tecidos e dos vasos sanguíneos da retina e da coroide, a integridade da anatomia da retina pelo OCT e a integridade vascular pela angiografia;
  - aspectos teciduais dos olhos por análises histopatológicas e imuno-histoquímicas.
- Realizar a radiomarcagem da leuc-a com o isótopo tecnécio-99m e determinar:
  - a pureza radioquímica como controle de qualidade;
  - a estabilidade de marcação do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a;
  - a depuração qualitativa do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a da cavidade vítrea de ratos saudáveis por meio de imagens cintilográficas.
- Investigar a degradação dos componentes da Matrigel pela leuc-a por meio de análise eletroforética e de western blotting.

**4 ETAPA EXPERIMENTAL 1: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO* DE CÉLULAS DO EPITÉLIO PIGMENTADO DA RETINA (ARPE-19) EXPOSTAS À LEUC-A**

---

A citotoxicidade da Leuc-a foi determinada por viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico da sulfarrodamina B (SRB), descrito por Skehan (1990).

#### 4.1 Materiais

- Leuc-a, produto natural purificado do veneno da serpente *Bothrops leucurus*, cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED).
- Linhagem de células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) (BCRJ, Brasil).
- Meio de cultura DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco®, EUA).
- Água ultrapura (Mili Q® plus, Merck Millipore, EUA).
- Soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, EUA).
- Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, EUA).
- PSA 100 x (penicilina - estreptomicina -anfotericina B) (Gibco®, EUA).
- Sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich, EUA).
- Tris base (Sigma-Aldrich, EUA).
- Ácido Tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, EUA).
- Ácido Acético (Synth, Brasil).
- Leitor de Elisa (Benchmark Plus, Bio-Rad, EUA).
- Microscópio óptico Axio Imager M2 (Zeiss, Alemanha).

#### 4.2 Preparo das soluções de trabalho da leuc-a

A leuc-a foi extraída, purificada e liofilizada a partir de uma alíquota da peçonha da serpente *Bothrops leucurus*. O produto liofilizado foi então ressuspense em água destilada para uma concentração de 1,0 mg/mL. A partir dessa solução estoque foram preparadas as concentrações de trabalho (12,5, 25,0, 50,0, 100,0, 200,0 e 500,0 µg/mL) pela diluição com tampão fosfato-salino (PBS). A solução estoque foi mantida em congelamento ao longo do estudo.

### 4.3 Avaliação *in vitro* da leuc-a em células ARPE-19 pelo método da sulfarrodamina B

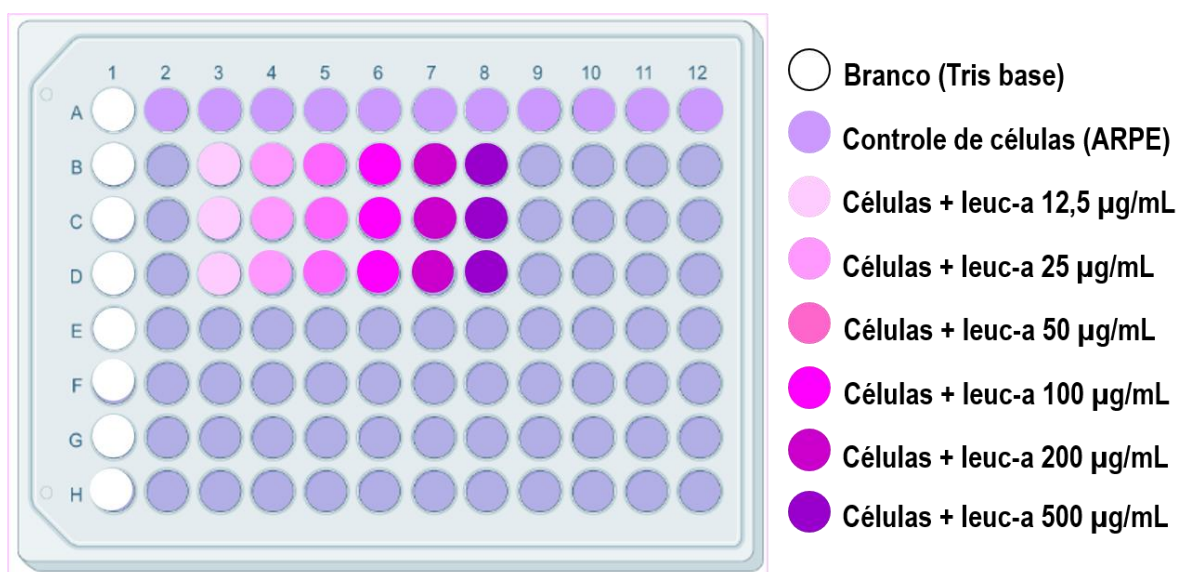
As células ARPE-19 foram cultivadas em garrafas de cultura celular em meio DMEM-F12 suplementado com SFB (soro fetal bovino) 10% e PSA 1%, sob atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, até o dia do ensaio. Utilizou-se placas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL/poço da suspensão celular (10<sup>5</sup> células/mL). As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h, sendo que após esse período adicionou-se os tratamentos preparados a partir de uma solução estoque de Leuc-a, conforme apresentado no **Quadro 1**, em triplicata, e incubou-se a placa por mais 48 h. O esquema da placa utilizada nesse estudo está representado na **Figura 8**. As células foram, então, fixadas com 100 µL de uma solução de TCA (ácido tricloroacético) a 10% (v/v) e incubadas por 1 h a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada e mantidas à temperatura ambiente até secagem completa. As células foram coradas com a adição de 100 µL da solução de SRB a 0,057% (p/v), por 30 min. Em seguida, as cavidades foram lavadas com solução de ácido acético 1% (v/v) para a remoção do corante não ligado às proteínas. Novamente as placas foram mantidas à temperatura ambiente para secagem. Uma vez completamente secas, as placas foram fotografadas por câmera acoplada ao microscópio óptico. Na sequência foram adicionados 100 µL da solução de tris base 10 mM (pH 10,5) em cada cavidade para solubilizar o corante ligado às proteínas celulares.

Os valores de absorbância foram medidos em espectrofotômetro de placas, modelo Spectra Max Plux 384 – Molecular Devices®, utilizando o software Softmax Pro 6.51®, a 540 nm. Foram realizados três experimentos diferentes, em passagens celulares diferentes.

Quadro 1 – Relação dos grupos de estudo para a avaliação da viabilidade celular da leuc-a.

Solução estoque Leuc-a	Grupos de tratamento (n=3 poços)	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )
1,0 mg/mL	1	12,5
	2	25,0
	3	50,0
	4	100,0
	5	200,0
	6	500,0

Figura 8 – Esquema de placa utilizada no estudo de viabilidade celular da leuc-a.



A porcentagem de viabilidade celular foi determinada segundo a **Equação 1**. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de viabilidade celular  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram avaliados por meio da análise de variância - ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, adotando-se um nível de significância de  $\alpha < 0,05$ . Além disso, determinou-se a concentração inibitória de 50% ( $\text{IC}_{50}$ ), por meio da curva dose-resposta, calculada pelo programa GraphPad Prism<sup>®</sup>5.

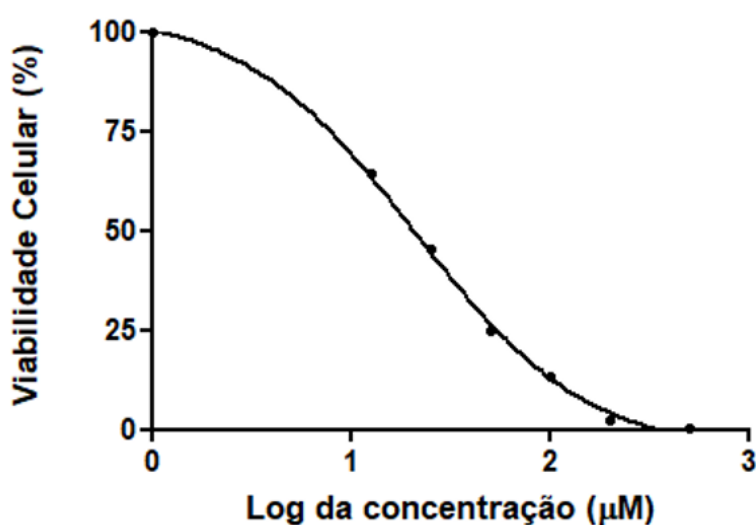
$$\text{Viabilidade celular} = 100 \times \frac{\text{Absorbância por poço} - \text{Média da absorbância de tris base}}{\text{Média da absorbância do controle} - \text{Média da absorbância da tris base}} \quad (1)$$

#### 4.4 Resultados e discussão

##### 4.4.1 Avaliação *in vitro* da leuc-a em células ARPE-19 pelo método da sulfarrodamina B

O método da SRB avalia a ligação do corante (sulfarrodamina B) aos aminoácidos básicos presentes nas proteínas das células viáveis fixadas pelo TCA. Assim, a citotoxicidade de um composto pode ser inferida pela intensidade da coloração das células, uma vez que quanto mais citotóxico for um composto, menor o número de células viáveis e, portanto, menor a concentração do substrato que irá se ligar ao corante. A **Figura 9** apresenta a curva de viabilidade celular para o log das concentrações testadas de Leuc-a após 48 h.

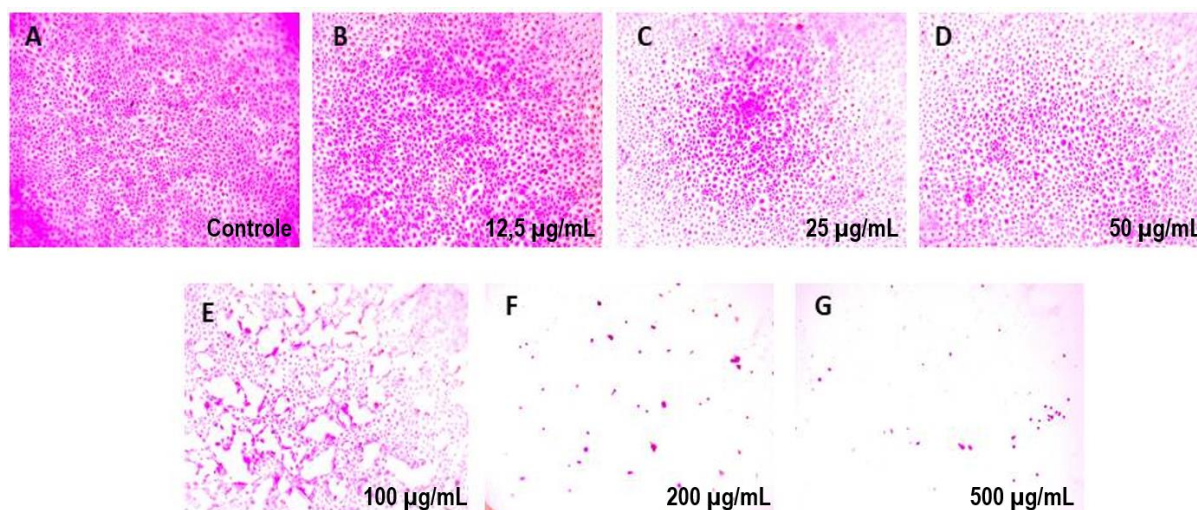
Figura 9 – Curva da viabilidade celular em linhagem ARPE-19 após tratamento com leuc-a por 48 h.



De acordo com a análise estatística realizada, houve diferença significativa de todos os grupos de tratamento entre si e comparado ao controle. Pelo gráfico apresentado na **Figura 9** é possível observar que nenhuma das seis concentrações de leuc-a testadas apresentou viabilidade celular igual ou superior a 80 %, o que é um indicativo, a princípio, da citotoxicidade desse composto frente à linhagem celular avaliada. A partir da curva dose-resposta foi calculada, ainda, a IC<sub>50</sub> da leuc-a, obtendo-se um valor de 26,64 µg/mL após 48 h de tratamento.

Além da análise quantitativa, as células foram avaliadas qualitativamente quanto à população celular e a aspectos morfológicos por meio de fotografias obtidas por câmera acoplada ao microscópio óptico. As imagens mostradas na **Figura 10** acompanham o padrão dose-resposta obtido pela curva da viabilidade celular, ainda que, visualmente, a concentração de 12,5 µg/mL não tenha se mostrado muito diferente do grupo controle.

**Figura 10** – Células da linhagem ARPE-19 coradas com SRB e fotografadas em aumento de 5 x, sendo (A) Controle – tratamento com meio de cultura; (B), (C), (D), (E), (F) e (G) e tratamentos por 48 h com leuc-a 12,5, 25, 50, 100, 200 e 500 µg/mL, respectivamente.



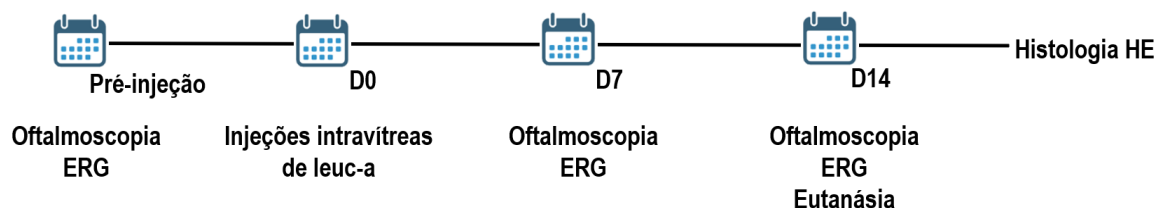
Gremski e colaboradores (2007) avaliaram a citotoxicidade tanto da leuc-a pura quanto do veneno bruto de *B. leucurus*, nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL, em células endoteliais de aorta de coelho. Nesse estudo, a viabilidade celular só foi reduzida com a concentração de 100 µg/mL de Leuc-a, enquanto o veneno mostrou-se mais tóxico, com viabilidade de aproximadamente 20 %, o que pode ser explicado pela presença de inúmeros componentes tóxicos no veneno que, juntos, podem agir sinergicamente ao potencializar os efeitos deletérios. Essa citotoxicidade observada pode ser atribuída à atividade direta nas células endoteliais ou a mecanismos indiretos secundários à ação proteolítica nos componentes da matriz extracelular. A divergência de resultados obtidos neste trabalho e no estudo citado pode ser explicada tanto pela utilização de linhagens celulares diferentes, quanto de métodos diferentes para avaliar a viabilidade celular, uma vez que as análises de Gremski *et al*, 2007 foram realizadas por citometria de fluxo e Sytox Green. Já no trabalho de Bernardes-Oliveira e colaboradores (2016), avaliou-se a atividade e toxicidade de *Bothrops jararaca*, uma outra espécie do mesmo gênero da serpente da qual a leuc-a é extraída. Nesse trabalho foi utilizado um método também colorimétrico, o MTT, para avaliação da viabilidade celular; em fibroblastos saudáveis, obteve-se uma maior porcentagem de células viáveis, aproximadamente 70%, com a dose de 25 µg/mL. Os autores consideraram o resultado obtido de 70% como sendo viável, o que estaria próximo daquele obtido neste trabalho para a dose de 12,5 µg/mL (BERNARDES-OLIVEIRA *et al.*, 2016).

**5 ETAPA EXPERIMENTAL 2: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E SEGURANÇA *IN VIVO* DA LEUC-A EM RATOS NÃO PIGMENTADOS WISTAR PELO EXAME DE ELETORRETINOGRRAFIA**

---

As etapas envolvidas no desenvolvimento dessa seção estão demonstradas na **Figura 11**.

**Figura 11 – Protocolo experimental da avaliação da toxicidade e segurança *in vivo* da leuc-a em ratos Wistar pelo exame de eletrorretinografia.**



## 5.1 Animais

Foram utilizados ratos machos não pigmentados da raça Wistar, pesando entre 200 e 220 g, adquiridos no biotério central (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com ração e água *ad libitum*, com ciclo claro-escuro respeitado. Todos os procedimentos experimentais com animais foram realizados em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). Os protocolos dos sistemas em avaliação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FUNED sob o protocolo 02/2018 (**ANEXO I**).

## 5.2 Materiais

- Leuc-a, produto natural purificado da serpente *Bothrops leucurus*, cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED).
- Cloridrato de de cetamina (Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio, Brasil).
- Cloridrato de xilasina (Anasedan<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio, Brasil).
- Cloridrato de tetracaína 1%.
- Cloridrato de fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio<sup>®</sup>, Allergan, EUA).
- Mydriacyl<sup>®</sup> (Alcon, EUA).
- Agulha ultra fine II 0,3 mm (BD, Brasil).
- Água ultrapura (Mili Q<sup>®</sup> plus, Merck Millipore, EUA).

- Microscópio óptico Axio Imager M2 (Zeiss, Alemanha).
- Tonômetro veterinário (Tono-PenVet<sup>®</sup>, EUA).
- Eletrorretinograma Espion E2 Colordome, estimulador de LED Ganzfeld (ColorDome desktop Ganzfeld, Diagnosys LLC, MA).
- Eletrodos tipo agulha e lente (ERG Jet, Fabrial SA, Suíça). Estimulador de LED Ganzfeld (ColorDom<sup>®</sup> desktop Ganzfeld, Diagnosys LLC, Massachusetts, EUA).

### 5.3 Injeções intravítreas das soluções de leuc-a

A toxicidade da leuc-a sobre a retina foi avaliada após as injeções intravítreas de soluções contendo a proteína previamente purificada, em olhos de ratos adultos machos da espécie Wistar. Os animais foram divididos em quatro grupos de tratamento, conforme apresentado no **Quadro 2**.

**Quadro 2 – Relação dos grupos de estudo para avaliação da toxicidade e segurança da leuc-a após as administrações intravítreas.**

Grupos ( <i>n</i> =4)	Concentração leuc-a (µg/mL)
1	12,5
2	25,0
3	50,0
4	100,0
Controle ( <i>n</i> =2)	-

Os animais de todos os grupos receberam nos olhos direitos injeções de 5 µL das soluções de leuc-a nas doses apresentadas, ou 5 µL de PBS pH 7,4 estéril para os animais controle. Para o cálculo das concentrações de trabalho, foram considerados o volume de 5 µL da solução injetada e o volume de aproximadamente 40 µL do vítreo, de modo que as soluções foram preparadas nove vezes mais concentradas para atingirem a concentração desejada quando injetadas na cavidade vítrea.

Para a realização das injeções intravítreas, os animais foram previamente anestesiados por injeção intraperitoneal de uma solução contendo xilazina 10 mg/kg e ketamina 90 mg/kg, os olhos foram anestesiados com cloridrato de tetracaína 1 % e dilatados com colírio de cloridrato de fenilefrina 0,1 %. As injeções foram realizadas com uma seringa de insulina e agulha 30 G, próximo ao limbo, com retenção de cerca de 30 s antes da remoção da agulha, a fim de evitar extravasamento da solução, como demonstrado na **Figura 12**.

**Figura 12 – Demonstração das injeções intravítreas nos olhos de ratos Wistar.**



Fonte: da autora.

#### **5.4 Avaliação clínica**

Durante todo o período do experimento, os olhos dos animais tratados foram avaliados clinicamente por inspeção ocular e oftalmoscopia binocular indireta (Omega 500 Binocular Indirect Ophtalmoscope, Heine Optotechnik, Herrsching, Alemanha), a fim de avaliar o fundo do olho dos animais e detectar possíveis alterações oculares. As imagens foram realizadas em modo vídeo por meio de câmeras de *smatphones* (Iphone® SE – Apple®, Cupertino, CA, EUA), com consequente captura da imagem estática.

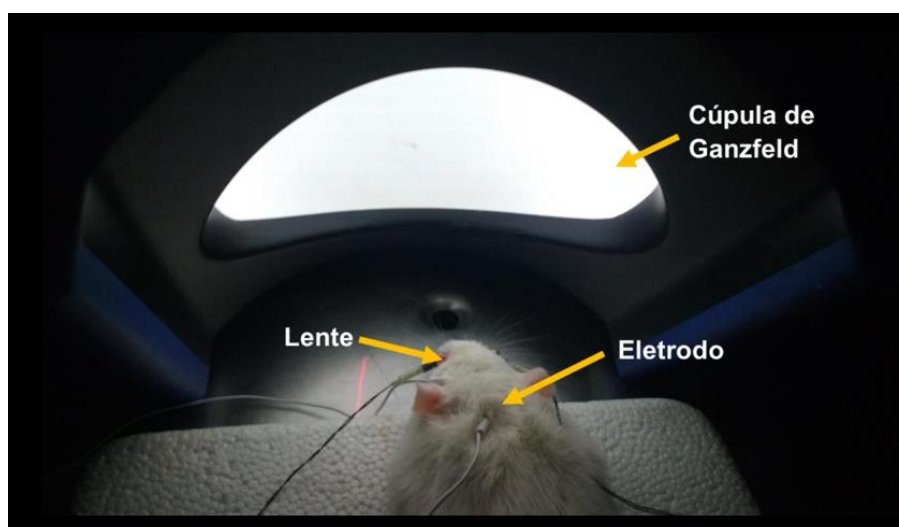
Avaliou-se também a pressão intraocular (PIO) utilizando o tonômetro veterinário TonoPen XL (Reichert Technologies, Buffalo, NY), sempre no mesmo horário. As duas avaliações foram realizadas antes das injeções intravítreas, como controle, e sete e 14 dias após as administrações. A PIO foi calculada com base na média de 3 leituras

para cada olho, sendo que a diferença de valores entre os períodos avaliados foi calculada subtraindo o valor obtido da PIO nos dias sete e 14 pelo valor obtido antes das injeções. Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup>5 e adotando-se um nível de significância de  $\alpha < 0,05$ .

### 5.5 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma

As análises funcionais da retina por ERG foram realizadas antes das injeções intravítreas, como controle, e sete e 14 dias após as injeções, conforme protocolo estabelecido pela ISCEV (*International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*). Para isso, os animais foram adaptados ao escuro por 12 h, anestesiados via injeção intraperitoneal de uma solução contendo xilazina 10 mg/kg de ketamina 90 mg/kg. Os olhos foram anestesiados com colírio de cloridrato de fenilefrina 0,1%, e as pupilas dilatadas com colírio de tropicamida 1% 15 min antes do início do exame. Os animais foram posicionados sobre um suporte de isopor adaptado à cúpula de Ganzfeld (**Figura 13**).

**Figura 13 - Exame de eletrorretinografia, indicando a Cúpula de Ganzfeld e o posicionamento do animal, dos eletrodos e da lente.**



Fonte: da autora.

As respostas ERG foram adquiridas, simultaneamente, nos dois olhos utilizando eletrodo bipolar do tipo lente sobre a córnea (eletrodos ERG Jet, Fabrial SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça); eletrodos do tipo agulha foram fixados subcutaneamente na pele, na região frontal acima dos olhos, e o eletrodo-terra foi fixado subcutaneamente no dorso do animal. Os olhos foram estimulados usando um estimulador de LED Ganzfeld (ColorDome™ desktop Ganzfeld, Diagnosys LLC, Littleton, MA).

Para exames do tipo escotópico, flashes de luz branca (6500 K) com duração de quatro ms foram conduzidos em 11 *steps*, sendo os *steps* seis e 11 os principais: a intensidade luminosa de 0,01 cd.s.m<sup>-2</sup> para avaliação da função dos bastonetes e a intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m<sup>-2</sup> para avaliação da função dos cones e bastonetes.

Para a realização do ERG fotópico, os animais foram adaptados à luz (luz de fundo de 3,0 cd.s.m<sup>-2</sup>) por dez min. Em seguida, foi utilizada a intensidade de 3,0 cd.s.m<sup>-2</sup> com duração de quatro ms, seguida de um sinal *Flicker* de 30 Hz da mesma intensidade luminosa e duração.

Finalizado o ERG fotópico, as respostas foram amplificadas (filtragem: 0,3-300 Hz) e armazenadas para análise *off-line* usando o *Espion E<sup>3</sup>* (Diagnosys LLC, Lowell, MA). Os dados foram avaliados a partir de comparações entre as amplitudes das ondas a e b, sob as intensidades de estímulo luminoso citadas. As comparações foram realizadas tanto para as concentrações de Leuc-a aplicadas, quanto para o intervalo de tempo dos exames.

Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias ( $\alpha < 0,05$ ) com pós-teste de Bonferroni, a fim de se comparar as alterações decorrentes dos dias e das concentrações avaliadas, tendo-se como referência os olhos controles (veículo).

## 5.6 Avaliação histológica

Para a avaliação histológica, ao final do último ERG os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico (270:30 cetamina/xilazina mg/kg) e os olhos preparados para a análise.

Os bulbos oculares foram enucleados e fixados em solução de Davidson (álcool 95 %, formaldeído, ácido acético glacial e água destilada) por 24 h para fixação. Em

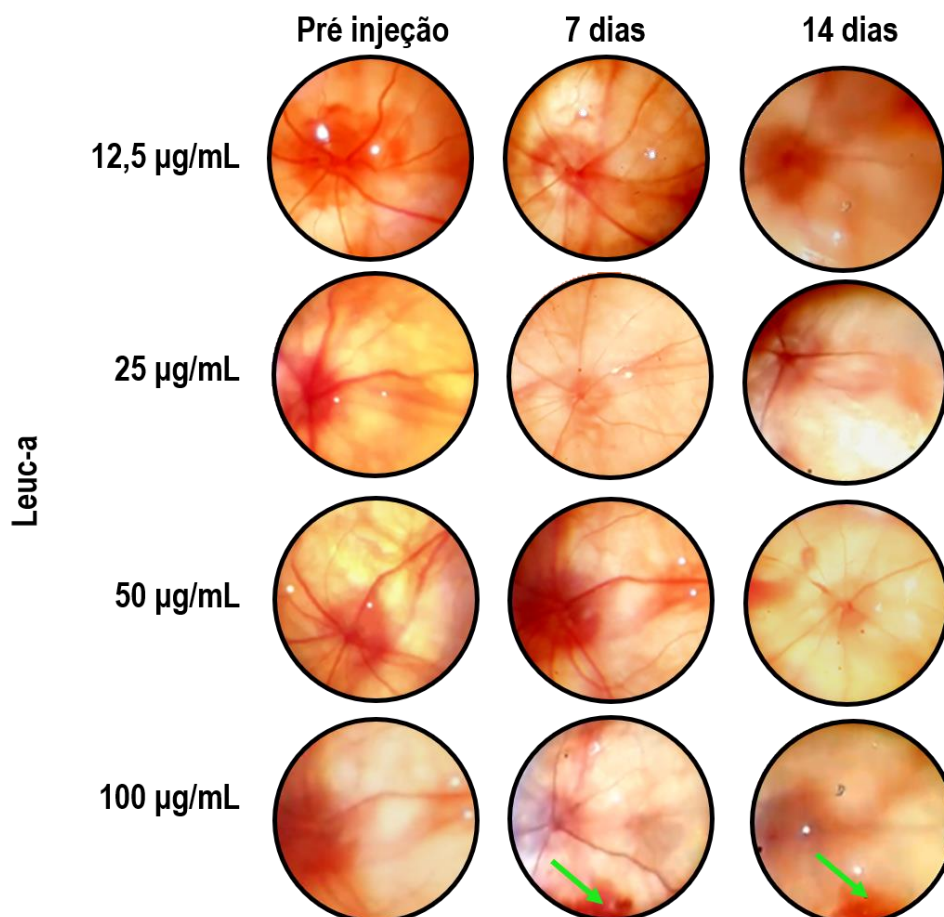
seguida, os olhos foram transferidos para uma solução de álcool 70 %, na qual permaneceram por mais 24 h para desidratação. Após essas duas etapas, os olhos foram seccionados transversalmente ao nervo óptico com o auxílio de um bisturi. As amostras foram, então, emblocadas em parafina e os cortes micrométricos foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (HE) antes de serem levados ao microscópio óptico para análise. As lâminas foram avaliadas quanto à espessura e organização das camadas celulares da retina, que permitem inferir sobre a integridade desse tecido frente à injeção intravítrea da leuc-a.

## **5.7 Resultados e discussão**

### *5.7.1 Avaliação clínica*

O aspecto da retina foi avaliado pela análise do fundo de olho dos animais antes e após as injeções intravítreas de PBS (controle) ou leuc-a. A **Figura 14** apresenta as imagens obtidas para as diferentes doses testadas nos períodos pré injeção, sete e 14 dias após as injeções.

**Figura 14 -** Imagens do fundo de olho de ratos Wistar nas doses de 12,5, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  nos períodos pré injeção, 7 e 14 dias após as injeções intravítreas.

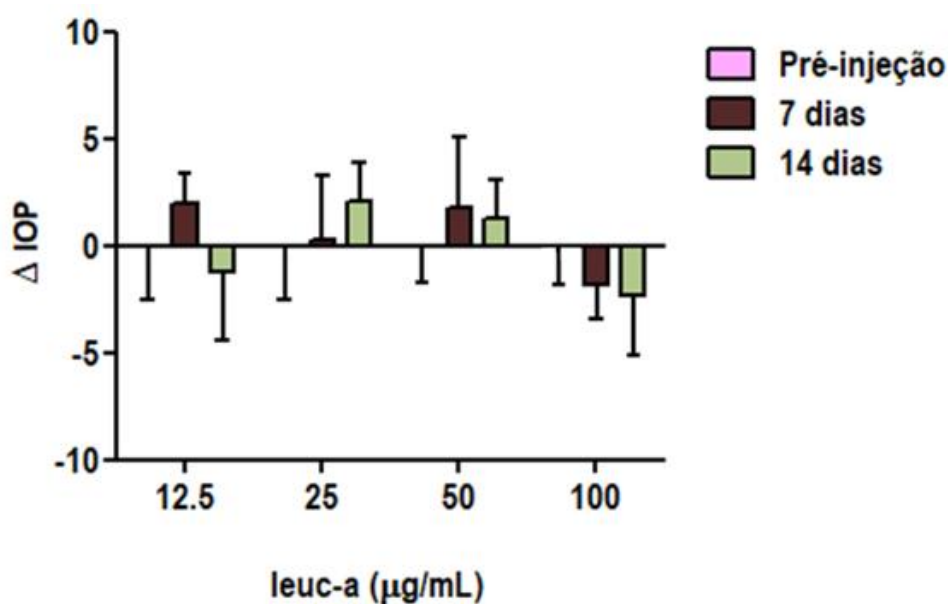


Apesar da possível perda de qualidade das imagens em decorrência da técnica e do aparelho empregados, não são observadas hemorragias, descolamento da retina, processo isquêmico ou outra alteração ocular indicativa de toxicidade retiniana para as doses de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, para a dose de 100  $\mu\text{g/mL}$ , sete dias após a injeção é possível observar um pequeno foco hemorrágico, apontado pela seta verde, que permanece com 14 dias. Ainda que essas alterações pudessem ser decorrentes de falha na injeção, os resultados posteriores apresentados pelo exame do ERG e pela análise histológica corroboram o indicativo de toxicidade decorrente da administração da dose de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

A PIO dos animais foi monitorada durante todo o experimento. Trata-se de um parâmetro importante que permite acompanhar a progressão de doenças capazes de

gerar eventos vasculares ao nervo óptico (ANTUNES et al., 2008). Variações na PIO podem ocorrer tanto pelo balanço entre a produção e a drenagem do humor aquoso, quanto como consequência do estabelecimento de processos inflamatórios oculares (ZOU et al., 2011). Na **Figura 15** está representada a variação da PIO dos olhos dos animais nos tempos de sete e 14 dias em relação à PIO inicial, correspondente à pré-injeção. A análise estatística dos dados apresentados comprovou a inexistência de diferença significativa tanto entre as diferentes doses para um mesmo tempo quanto nos diferentes tempos de cada dose, ou seja, a PIO manteve-se estável durante todo o experimento.

**Figura 15 –** Variação da PIO dos ratos Wistar nas doses de 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  nos períodos pré injeção, 7 e 14 dias após as injeções intravítreas.



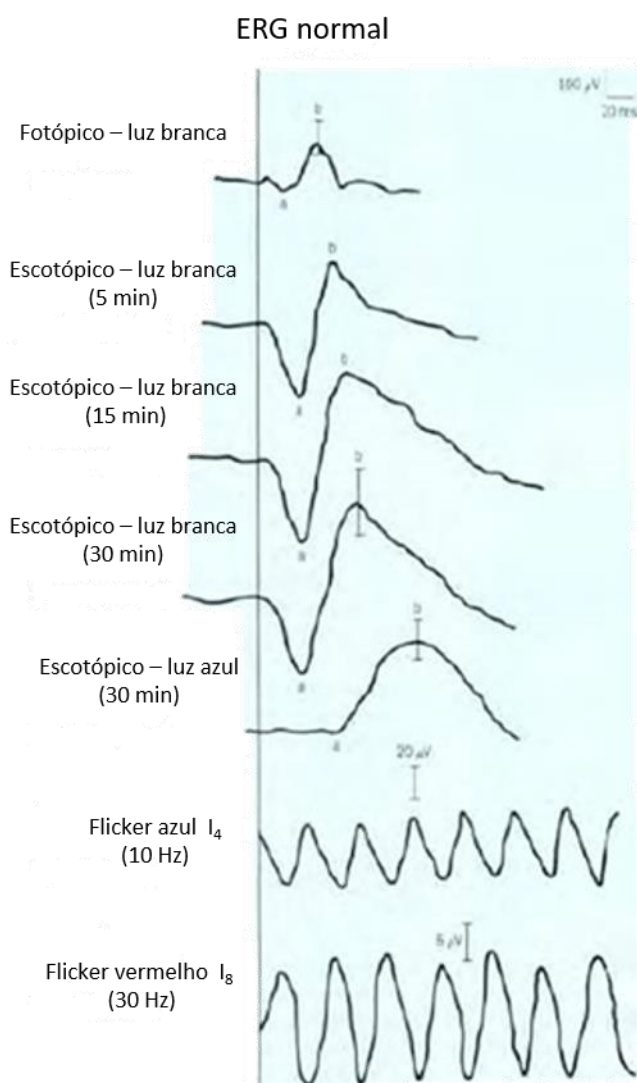
### 5.7.2 Estudo funcional da retina por ERG

O ERG de campo total é uma técnica não invasiva que avalia a função da retina desde o EPR até a camada mais interna das células ganglionares, sendo o exame mais utilizado em experimentação animal para avaliação funcional da retina (BOYES et al., 2016; HUANG et al., 2015). O rato é um modelo animal bastante adequado para avaliação da toxicidade intraocular de fármacos, uma vez que a estrutura celular da retina desse animal é semelhante à retina humana, além de possuir um sistema vascular que emerge radialmente do disco óptico, como nos humanos.

Os eletrodos utilizados no animal durante o exame são capazes de medir a resposta dos diferentes tipos celulares da retina aos estímulos luminosos, gerando sinais elétricos na forma de uma onda senoidal bifásica, sendo que as respostas provenientes da neuroretina são traduzidas pelas ondas a e b. A onda a é uma deflexão negativa resultante da hiperpolarização dos fotorreceptores (cones e bastonetes), enquanto a onda b é uma deflexão positiva gerada pelas células bipolares e de Müller da camada nuclear mais interna da retina. A diminuição da amplitude de qualquer uma dessas ondas pode ser atribuída a distrofias retinianas; por outro lado, o aumento exagerado da amplitude costuma ser derivado de distrofias dos cones. As respostas elétricas das células retinianas aos *flashes* luminosos podem ser medidas em ciclos adaptados tanto ao escuro, escotópico, quanto ao claro, fotópico. No exame escotópico, os animais são submetidos a *flashes* luminosos de baixa intensidade, seja de *flash* único ou de sinal *flicker* de dez Hz, para induzir a ativação dos bastonetes, de modo que quanto maior o período de adaptação ao escuro, maior a sensibilidade dos bastonetes e menor a estimulação dos cones. Já no exame fotópico, a alta intensidade luminosa à qual os animais são expostos, seja de *flash* único ou de sinal *flicker* de 30 Hz, é capaz de induzir a ativação dos cones e suprimir a atividade dos bastonetes. A alta luminosidade produzida por *flashes* de luz branca em ciclos adaptados ao escuro induz a resposta combinada de cones e bastonetes, sendo que em condições normais a resposta é predominantemente do sistema dos bastonetes. As ondas obtidas são caracterizadas por elementos temporais, como latência (tempo entre o início do estímulo luminoso e o início da resposta da onda a), tempo implícito (tempo entre o início do estímulo luminoso até o pico da amplitude da onda b) e duração, além dos elementos bioelétricos, como a

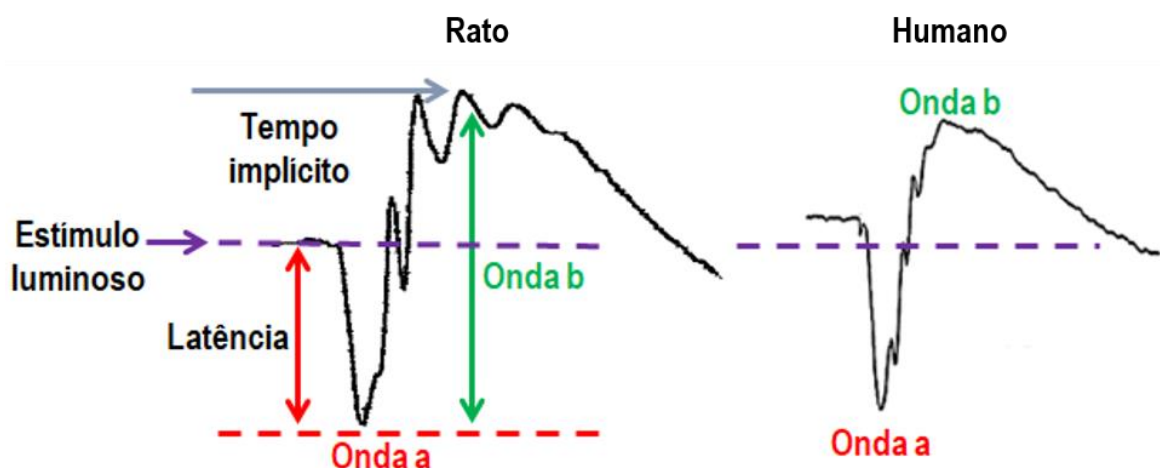
medida da amplitude (BENCHORIN et al., 2017; BOYES et al., 2016; FULTON et al., 2009; HANSEN et al., 2016; HUANG et al., 2015; LIU et al., 2006; PERLMAN, 2009). Essas características estão demonstradas nas **Figuras 16 e 17**.

**Figura 16 – Respostas normais obtidas por meio do ERG sob condições escotópicas e fotópicas.**



Fonte: adaptado de (FISHMAN et al., 2001).

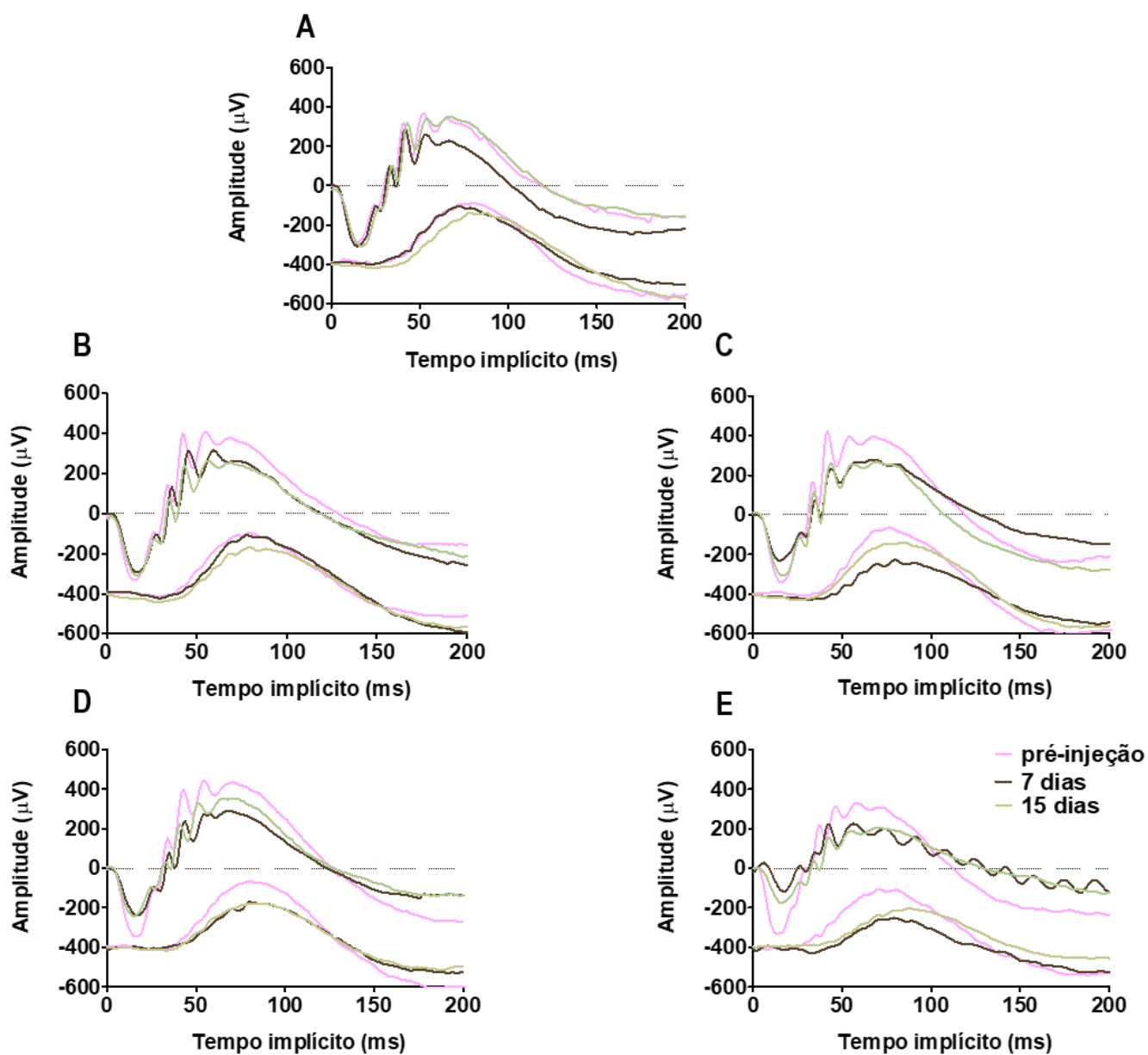
Figura 17 – Respostas ERGs escotópicas de ratos albinos e humanos diferem em amplitude e tempo implícito.



Fonte: adaptado de (PERLMAN, 2009).

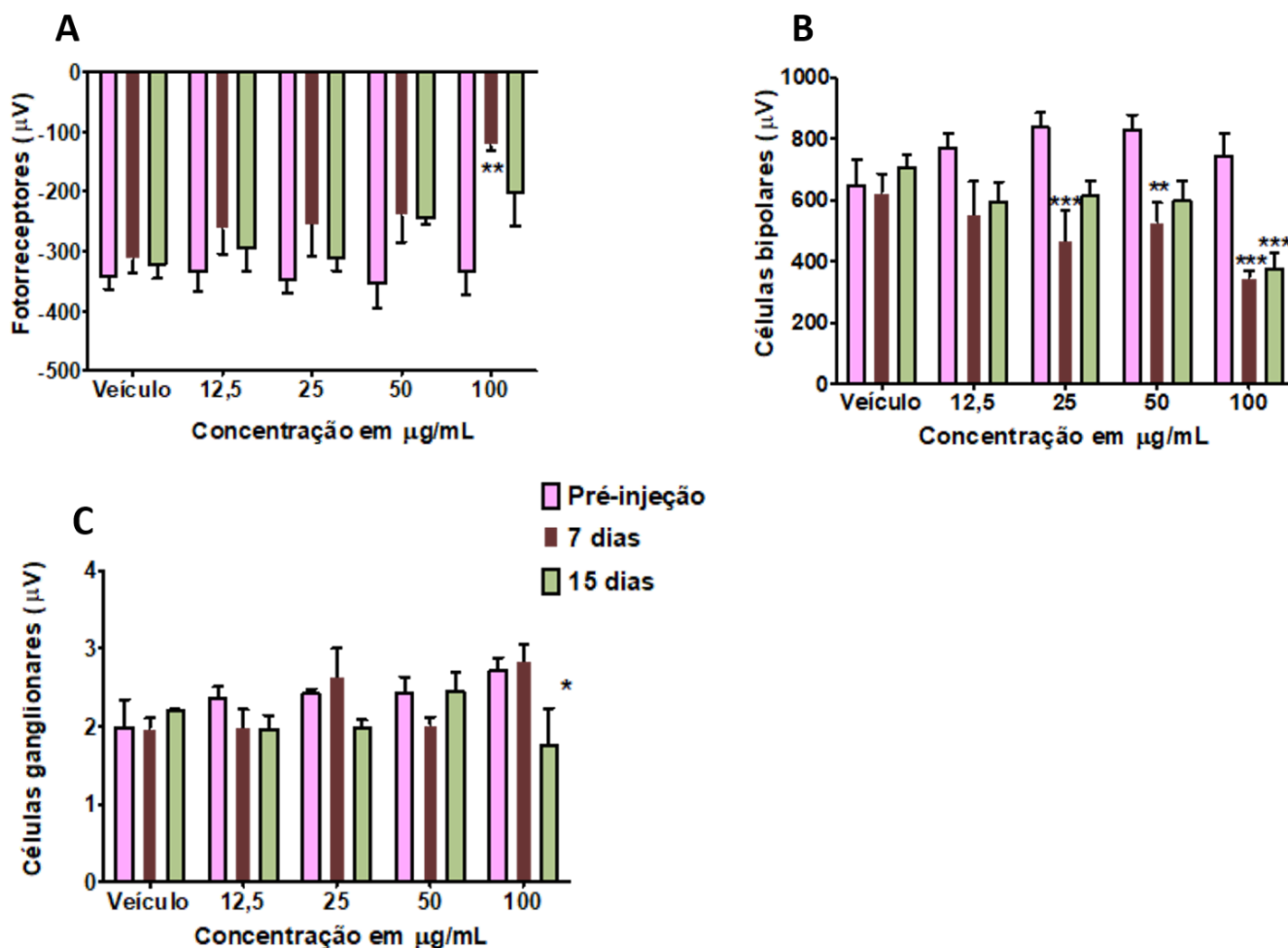
As análises do ERG foram realizadas pela comparação entre as amplitudes e os tempos implícitos das ondas a e b sob diferentes intensidades de estímulo luminoso e após adaptação ao escuro. Por meio da avaliação desses parâmetros foi possível inferir sobre a funcionalidade retiniana e, conseqüentemente, sobre a toxicidade da substância administrada. A **Figura 18** apresenta as respostas escotópicas médias obtidas no ERG após os estímulos luminosos de  $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$  e  $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$  nos períodos predeterminados.

Figura 18 - Curva do eletrorretinograma (ERG) na condição escotópica ( $0,03$  e  $3,0$   $\text{cd.s.m}^{-2}$ ), 7 e 14 dias após injeção intravítrea de diferentes doses de Leuc-a, sendo (A) veículo, (B) Leuc-a  $12,5$   $\mu\text{g/mL}$ ; (C) Leuc-a  $25$   $\mu\text{g/mL}$ ; (D) Leuc-a  $50$   $\mu\text{g/mL}$  e (E) Leuc-a  $100$   $\mu\text{g/mL}$ .



As ondas a e b foram avaliadas nos *steps* nos quais as intensidades luminosas induzem a resposta máxima das células retinianas, sendo eles: *step* seis, na intensidade de  $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ , que estimula apenas células bipolares e bastonetes, gerando somente a onda b (deflexão positiva), e *step* 11, na intensidade de  $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ , que estimula preferencialmente cones, gerando a onda a (deflexão negativa), mas também estimula bastonetes, gerando a onda b. Pela análise dos gráficos apresentados na **Figura 19**, os quais foram plotados com as curvas dos dois *steps* simultaneamente, observa-se que para as doses de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  praticamente não houve diferença de amplitude ou deslocamento do tempo implícito para as ondas a e b em relação às curvas do veículo. A fim de verificar se houve diferença estatística das amplitudes das ondas entre as doses testadas e o veículo, as variáveis analisadas foram apresentadas na **Figura 19**.

**Figura 19 - Medidas das amplitudes das ondas a e b nos steps 6 e 11 das diferentes doses testadas, sendo (A) a amplitude da onda a no step 11; (B) a amplitude da onda b no step 11 e (C) a razão a/b no step 11.**



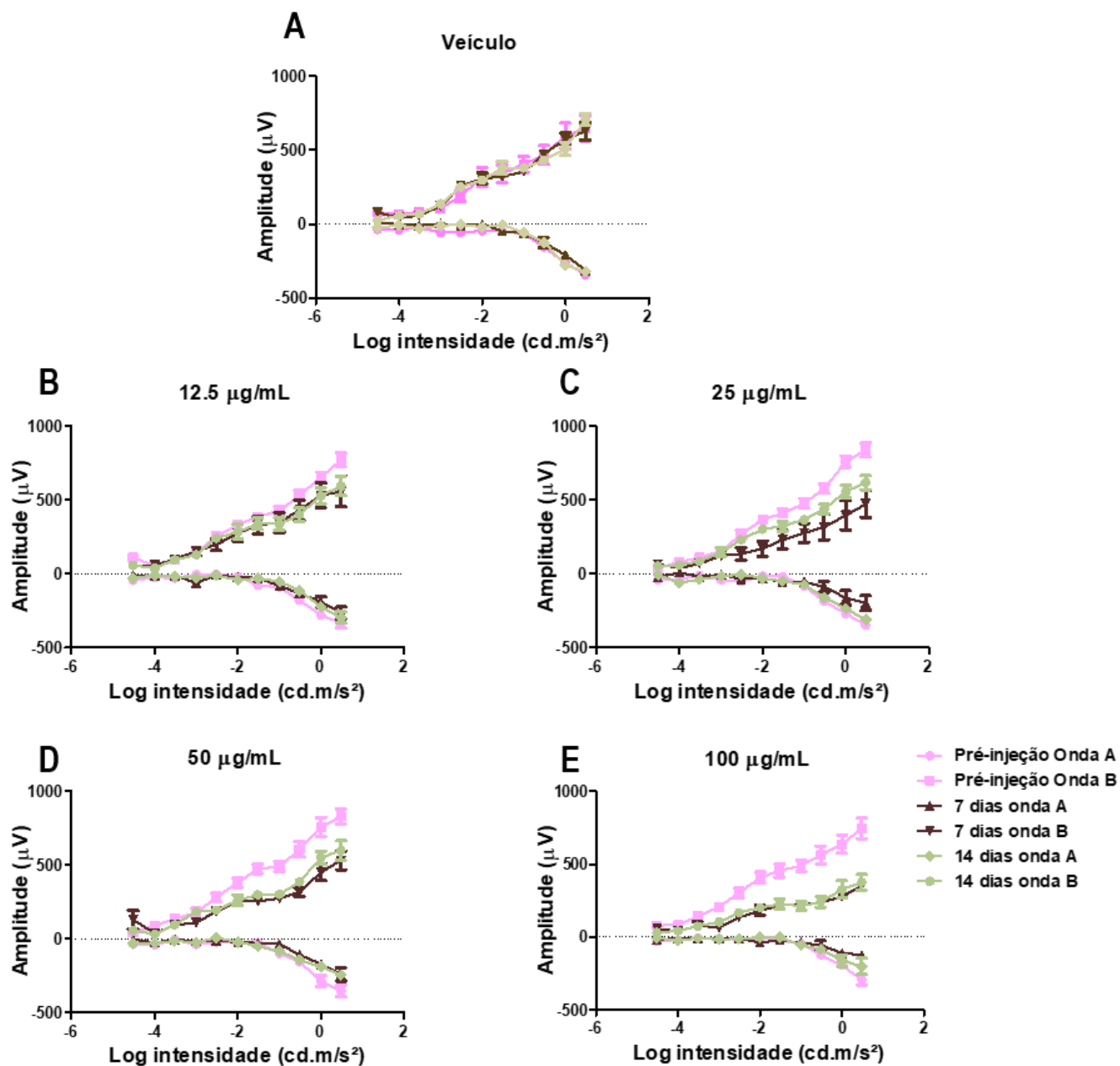
Diferença estatística em relação à pré-injeção \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

Pela **Figura 19 – A** pode-se observar que apenas a dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou redução significativa da amplitude da onda a no período de sete dias; entretanto, com 14 dias, essa diferença já não foi observada. O mesmo padrão é encontrado para as doses de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  com relação à amplitude da onda b (**Figura 19 – B**), ou seja, houve uma redução significativa da onda b apenas no período de sete dias. Considerando-se que a retina é um tecido que não apresenta autorregeneração, não é condizente associar a redução da amplitude das ondas a e b à morte ou desfuncionalização dos fotorreceptores e das células bipolares, uma vez que essas células não seriam capazes de se regenerar e recuperar a função com 14 dias. Dessa

maneira, pode-se atribuir as diferenças estatísticas encontradas para as doses de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  a lesões transitórias ou erros de análise do ERG, por se tratar de um exame bastante sensível e susceptível a oscilações, como dilatação da pupila, maior ou menor adaptação ao escuro, temperatura corporal, dentre outros fatores (DAMICO et al., 2012). Já para a dose de 100  $\mu\text{g/mL}$ , na **Figura 19 - B** é possível notar que a diferença estatística encontrada para o período de sete dias se repete para o período de 14 dias, isto é, a redução de amplitude da onda b pode ser atribuída à perda de função celular decorrente da toxicidade apresentada pela leuc-a nessa dose. Ainda, como a razão da amplitude da onda b sobre a amplitude da onda a ( $b\text{-amp}/a\text{-amp}$ ) reflete a integridade funcional dos fotorreceptores e das células bipolares, mais especificamente a transmissão de sinal entre elas, nota-se, pela **Figura 19 - C**, que apenas a dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou redução significativa dessa razão ao final do tempo de estudo.

Uma outra maneira de avaliar a funcionalidade das células retinianas é por meio da correlação entre as amplitudes das ondas a e b em função da intensidade luminosa, em que se pode avaliar a saturação dos fotorreceptores, isto é, à medida em que se aumenta a intensidade do estímulo luminoso, as respostas celulares aumentam proporcionalmente até se estabilizarem. Dessa forma, a toxicidade provocada por alguma substância injetada no olho pode fazer com que essas células se sensibilizem mais rapidamente, de tal maneira que a amplitude máxima da onda (representada por  $V_{\text{máx}}$  – ponto máximo no eixo y) ocorre com uma intensidade luminosa menor, uma vez que, nesse caso, baixos estímulos luminosos são suficientes para saturarem os fotorreceptores. Essa análise está representada nos gráficos de amplitude das ondas a e b em razão do log da intensidade luminosa, na **Figura 20**.

Figura 20 - Curvas de amplitude das ondas a e b em razão do log da intensidade luminosa nas diferentes doses testadas, sendo (A) veículo; (B) Leuc-a 12.5  $\mu\text{g/mL}$ ; (C) Leuc-a 25  $\mu\text{g/mL}$ ; (D) Leuc-a 50  $\mu\text{g/mL}$  e (E) Leuc-a 100  $\mu\text{g/mL}$ .



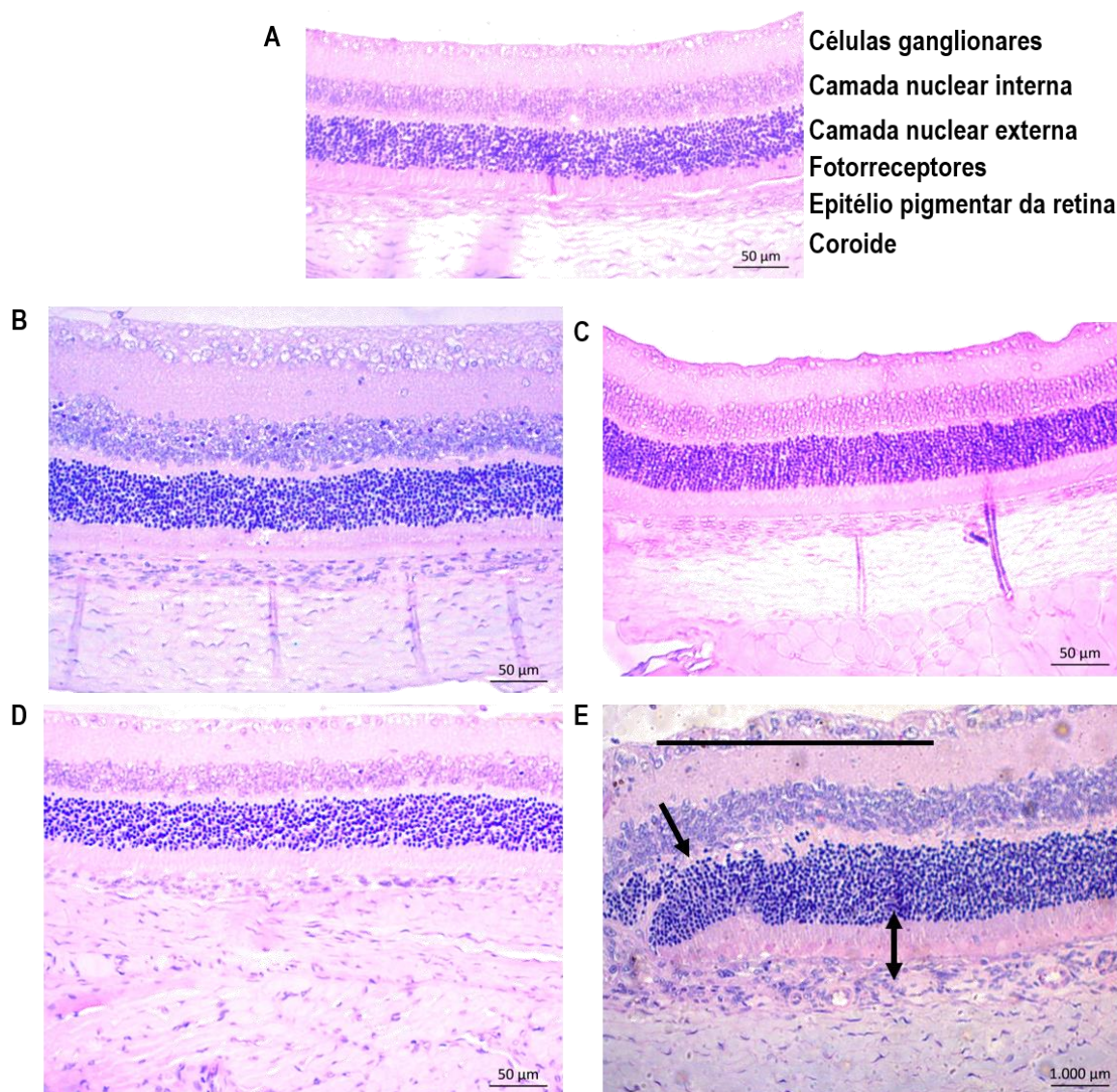
Analisando-se cada curva da **Figura 20**, é possível perceber que, para o veículo, praticamente não houve alteração do  $V_{m\acute{a}x}$  ao longo do período de estudo. Para as doses de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  foi observado o mesmo comportamento apresentado pelos gráficos anteriores (**Figura 19**), isto é, a redução de  $V_{m\acute{a}x}$  que ocorreu com sete dias se reestabeleceu com 14 dias. Da mesma forma, essa análise mostrou que o comportamento apresentado pela dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  também se repetiu; houve uma redução bastante acentuada do  $V_{m\acute{a}x}$  com sete dias e que permaneceu até 14 dias, principalmente na onda b, o que fornece mais indícios da desfuncionalização das células retinianas após a administração dessa dose.

Embora o rato seja um animal comumente utilizado para pesquisas na área de oftalmologia, sua retina é composta na sua maior parte por bastonetes. Alguns trabalhos já demonstraram que os cones apresentam pequena contribuição no eletrorretinograma, de modo que o mecanismo da resposta obtida ainda não é bem estabelecido, o que leva a resultados conflitantes (LI; BARNES; HOLT, 2006; MOJUMDER; SHERRY; FRISHMAN, 2020).

### *5.7.3 Avaliação histológica*

A avaliação histológica foi realizada com o objetivo de verificar se o padrão de toxicidade encontrado pela análise clínica e pelo ERG reproduz na estrutura e organização da retina 14 dias após a realização das injeções intravítreas. Os cortes histológicos estão apresentados na **Figura 21**.

**Figura 21 - Microscopia óptica de retina de rato corada por HE no tempo de 14 dias após a injeção intravítrea de (A) veículo; (B) Leuc-a 12,5 µg/mL; (C) Leuc-a 25 µg/mL; (D) Leuc-a 50 µg/mL; (E) Leuc-a 100 µg/mL.**



Assim como nos resultados obtidos pelo exame do ERG, observa-se a semelhança da arquitetura e morfologia celular da retina dos olhos que receberam as doses de 12,5, 25 e 50 µg/mL em relação àqueles que receberam PBS (veículo). As camadas celulares mostram-se preservadas e organizadas, sem evidências de desalinhamento, diminuição da espessura ou do número de células. Além disso, não foram encontrados sinais de necrose, fibrose ou a presença de infiltrado inflamatório.

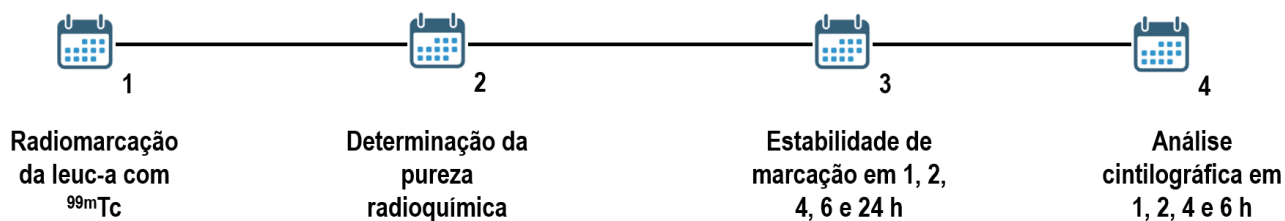
Para a dose de 100 µg/mL, contudo, os achados histológicos já se mostraram próximos à elevada toxicidade apresentada pelo ERG, de tal maneira que é possível perceber a desorganização das camadas celulares e um espessamento mais evidente da camada nuclear externa. Essas alterações retinianas são comumente descritas por outros autores como sinais da toxicidade de determinados compostos após injeção intraocular (KOH et al., 2019; MITORI et al., 2016; SUN et al., 2019).

**6 ETAPA EXPERIMENTAL 3: RADIOMARCAÇÃO DA LEUC-A COM TECNÉCIO-  
99m E AVALIAÇÃO DA DEPURAÇÃO DO COMPLEXO <sup>99m</sup>Tc-LEUC-A *IN VIVO***

---

As etapas envolvidas no desenvolvimento dessa seção estão demonstradas na **Figura 22**.

**Figura 22 – Protocolo experimental da radiomarcagem da leuc-a com o tecnécio-99m e avaliação qualitativa da depuração do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a da cavidade vítrea.**



## 6.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais com animais foram realizados em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). Os protocolos dos sistemas em avaliação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FUNED sob o protocolo 02/2018 (**ANEXO I**). Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 200 e 220 g, mantidos em gaiolas, alimentados com ração e água *ad libitum*, com ciclo claro-escuro respeitado.

## 6.2 Materiais

- Leuc-a, produto natural purificado da serpente *Bothrops leucurus*, cedido pela FUNED.
- $^{99m}\text{Tc}$  obtido de um gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  à base de alumina.
- Contador gama (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter®; PerkinElmer Inc., Massachusetts, EUA).
- Gama-câmara (Mediso, Budapest, Hungary).
- Todos os reagentes, incluindo o  $\text{SnCl}_2\text{O}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

### 6.3 Radiomarcção da leuc-a e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade

Para o processo de radiomarcção, 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de leuc-a a 1,0 mg/mL foram adicionados a um frasco de penicilina. Em seguida, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto estano (SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) em HCl a 0,25 M foi adicionada à solução salina contendo a leuc-a e o pH foi ajustado para 7,0 utilizando-se solução de NaOH 1 M. O frasco de penicilina foi então submetido à vácuo para receber uma alíquota de 0,1 mL de Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (37 MBq), de modo a não permitir a oxidação do <sup>99m</sup>Tc pelo oxigênio do ar. A solução final foi mantida em temperatura ambiente por 15 min para completar o processo de radiomarcção (FERNANDES et al., 2015).

A eficiência da radiomarcção foi avaliada pela quantificação da pureza radioquímica em cromatografia em camada delgada (CCD) em fitas de sílica gel, como fase estacionária, e acetona como eluente. <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> livre apresenta R<sub>f</sub> 1 enquanto os demais constituintes (<sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> e <sup>99m</sup>Tc-Leuc-a) apresentam R<sub>f</sub> próximos a 0. Dessa forma, é possível isolar o <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> livre na parte superior da fita, mantendo <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> e <sup>99m</sup>Tc-leuc-a na parte inferior. A fita foi, então, cortada ao meio e a radioatividade contida em cada parte determinada em contador gama (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter; PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). O percentual de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> livre foi determinado segundo a **Equação 2** abaixo:

$$\%TcO_4^- = \frac{\textit{atividade da parte superior} \times 100}{(\textit{atividade da parte superior} + \textit{atividade da parte inferior})} \quad (2)$$

Para a quantificação e remoção do <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub>, a solução contendo o produto radiomarcado foi filtrada em filtro 0,45  $\mu\text{m}$ . Para determinação do teor de <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub>, tanto o filtro quanto a solução filtrada foram levados ao contador gama e o teor foi calculado segundo a **Equação 3** (FERNANDES et al., 2015):

$$\%TcO_2 = \frac{\textit{atividade do filtro} \times 100}{(\textit{atividade do filtro} + \textit{atividade da solução filtrada})} \quad (3)$$

A pureza radioquímica foi determinada pelo somatório das impurezas TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> e TcO<sub>2</sub>.

#### **6.4 Determinação da estabilidade de marcação da leuc-a em solução salina**

A CCD também foi utilizada para estimar a estabilidade do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a na presença de solução salina 0,9 % (p/v). Para isso, a solução radiomarcada foi mantida em temperatura ambiente e a estabilidade radioquímica foi determinada em amostras coletadas nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 h após a incubação. Todas as amostras coletadas foram eluídas em CCD e as fitas de sílica gel foram levadas ao contador gama para quantificação do tecnécio-99m livre, ou seja, aquele que se dissociou da leuc-a.

#### **6.5 Avaliação qualitativa da depuração do complexo $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a após a administração intravítrea em olhos de ratos Wistar saudáveis**

Ratos Wistar (n=3) foram anestesiados via injeção intraperitoneal de uma solução contendo xilazina 10 mg/kg de ketamina 90 mg/kg, e os olhos anestesiados com colírio de cloridrato de fenilefrina 0,1 %. Após a radiomarcagem da leuc-a com  $^{99m}\text{Tc}$  e a determinação da pureza radioquímica, a solução foi filtrada para completa remoção do  $\text{TcO}_2$  e posterior injeção intravítrea nos animais.

Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a, o que corresponde a uma atividade de aproximadamente 10  $\mu\text{Ci}$ , foi injetada em apenas um dos olhos de cada animal. Os animais foram então levados à gama-câmara e posicionados sob o colimador de baixa energia e alta resolução para aquisição das imagens cintilográficas. As imagens foram obtidas logo após as injeções intravítreas e nos tempos de 1, 2, 4 e 6 h subsequentes, usando uma matriz de tamanho 256 x 256 x 16, com uma janela de energia de 20 % definida a 140 Kev, por um período de 300 s cada.

## 6.6 Resultados

### 6.6.1 Radiomarcção da leuc-a e determinação da pureza radioquímica como controle de qualidade

Por ser um radionuclídeo deficiente de elétrons, o  $^{99m}\text{Tc}$  complexa-se facilmente com compostos que apresentam em sua estrutura grupos doadores de elétrons, formando ligações covalentes. A leuc-a apresenta ligações dissulfeto formadas entre os grupos tiol de resíduos de cisteína que, quando quebradas pela ação do agente redutor ( $\text{SnCl}_2$ ), expõem pares de elétrons disponíveis para complexação com o  $^{99m}\text{Tc}$ .

A melhor condição do processo de radiomarcção é comumente definida como aquela que apresenta menor teor tanto de  $^{99m}\text{TcO}_4$ , uma vez que essa impureza representa o tecnécio que não foi reduzido e, portanto, não conseguiu complexar-se à leuc-a, quanto de  $^{99m}\text{TcO}_2$ , que representa o tecnécio que se ligou à água ou outro composto presente nos reagentes utilizados. Assim, apesar de haver um protocolo já bem estabelecido no Laboratório de Radioisótopos (DE BARROS et al., 2013; FERNANDES et al., 2015), em que o  $\text{SnCl}_2$  é utilizado como agente redutor do tecnécio, resolveu-se testar um outro protocolo em que, além do  $\text{SnCl}_2$ , é utilizado também o borohidreto de sódio ( $\text{BH}_4$ ), uma vez que a combinação dos dois agentes redutores poderia ser mais eficaz na quebra das pontes dissulfeto da leuc-a e consequente exposição de pares de elétrons para complexação. As condições testadas, bem como as respectivas impurezas radioquímicas, estão apresentadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1 – Variação das condições da radiomarcagem da Leuc-a para melhor controle da pureza radioquímica**

Condições	Volume final da amostra (salina + leuc-a)	Agente redutor	pH do meio	% TcO <sub>4</sub>	% TcO <sub>2</sub>
Condição 1	30 µL	SnCl <sub>2</sub>	7	0,1	12,9
Condição 2	30 µL	SnCl <sub>2</sub> + BH <sub>4</sub>	7	1,9	35,7

Ao contrário do esperado, o uso do BH<sub>4</sub> não foi melhor para a radiomarcagem da leuc-a e, portanto, optou-se por manter o protocolo original que corresponde à condição 1.

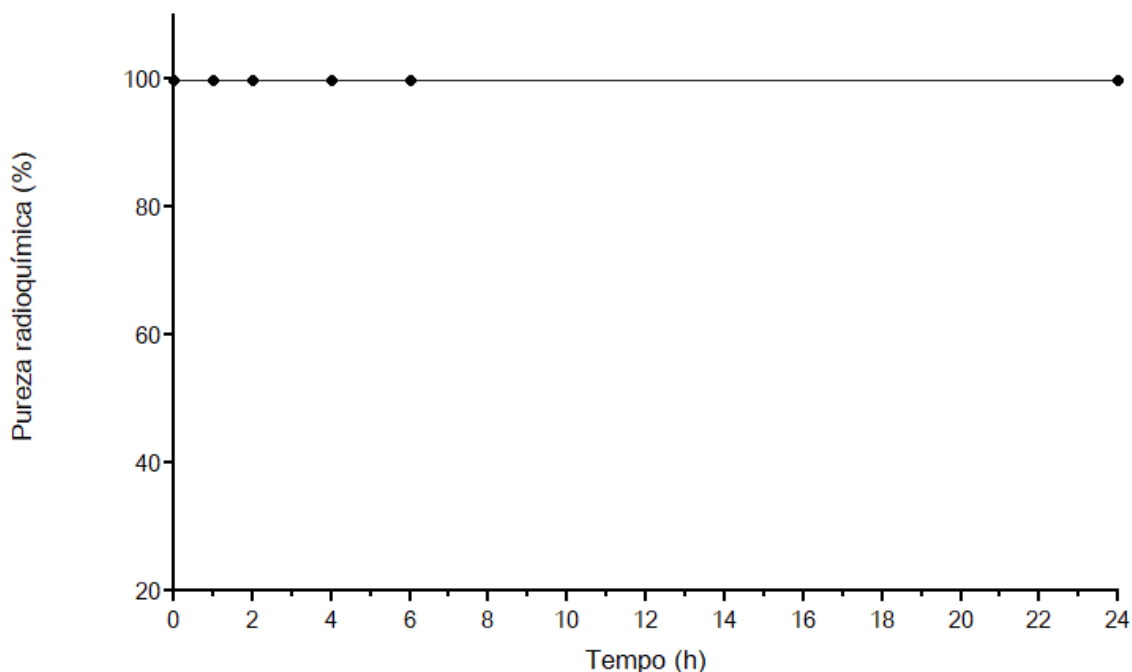
A solução do radiofármaco foi filtrada em filtro 0,45 µm, com o auxílio de uma seringa, de modo a reter todo o <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> no filtro. A partir de testes realizados em CCD e diferentes eluentes com a amostra filtrada, verificou-se que o complexo <sup>99m</sup>Tc-leuc-a não fica retido no filtro e, portanto, esse método pode ser utilizado para purificação da amostra.

De maneira geral, considera-se como satisfatório o processo de radiomarcagem quando a soma das impurezas (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> + <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub>) é menor ou igual a 10 %. Apesar dos resultados encontrados inicialmente não estarem dentro desse limite, após purificação em filtro 0,45 µm é possível obter uma preparação com teor mínimo de impurezas e compatível com a utilização in vivo.

#### *6.6.2 Determinação da estabilidade de marcação da leuc-a em solução salina*

Uma vez determinadas as condições ótimas de marcação da leuc-a, buscou-se estimar a estabilidade do complexo <sup>99m</sup>Tc-leuc-a na presença de solução salina 0,9 % (p/v) por CCD. A marcação da leuc-a em salina mostrou-se bastante estável e, por isso, é possível afirmar que <sup>99m</sup>Tc-leuc-a permanece complexado por até 24 h, como mostrado na **Figura 23**.

Figura 23 – Estabilidade *in vitro* do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -Leuc-a em função do tempo na presença de salina, em temperatura ambiente.



A complexação com alto rendimento e a estabilidade da radiomarcagem da leuc-a já eram previstas devido à presença dos resíduos de cisteína na sua estrutura, como demonstrado também por outros autores (LEVASHOVA et al., 2008; VERHAAR et al., 1996). Esse resultado é importante para a execução dos experimentos posteriores, uma vez que é possível garantir que o rastreamento do  $^{99m}\text{Tc}$  implica no rastreamento fiel da molécula de leuc-a.

#### 6.6.3 Avaliação qualitativa da depuração do complexo $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a após a administração intravítrea em olhos de ratos Wistar saudáveis

A farmacocinética de um composto é definida como a sua distribuição temporal e espacial em um sistema, sendo o resultado de diversos eventos complexos que podem ou não envolver transformações bioquímicas (FOSTER, 2007). Por se tratar de um procedimento invasivo, a avaliação do perfil farmacocinético de fármacos após a injeção intravítrea é essencial na determinação da dose e frequência de

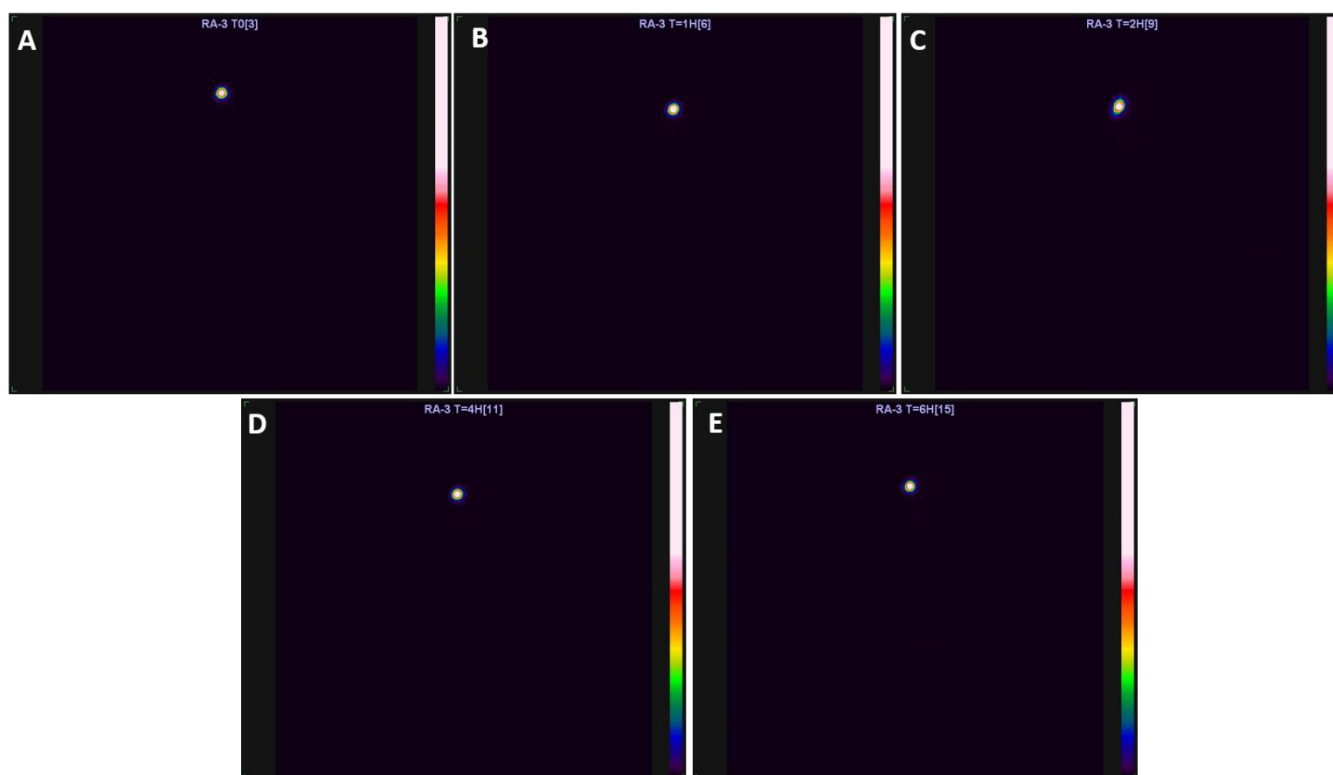
administração que garantem concentração terapêutica máxima com efeitos adversos mínimos.

Após a administração intravítrea, o fármaco se distribui pelos tecidos oculares conforme o seu coeficiente de partição. Estudos mostram que a farmacocinética intraocular de uma substância está diretamente relacionada com as suas propriedades físico-químicas, como peso molecular, lipofilicidade e a relação dose/solubilidade em pH 7,4. Características intrínsecas, como estrutura e composição do vítreo, bem como alterações relacionadas à idade e à presença de inflamação podem influenciar tanto na cinética do fármaco no vítreo quanto na sua chegada até a retina, que, nesse caso, é o tecido-alvo. Além disso, a presença de ácido hialurônico no vítreo é responsável pela carga negativa desse tecido, o que pode dificultar a permeação de moléculas carregadas positivamente (EDINGTON; CONNOLLY; CHONG, 2017; GARCÍA-QUINTANILLA et al., 2019; KIM et al., 2019).

A eliminação do fármaco ocorre pela vazão aquosa na câmara anterior via humor aquoso e fluxo sanguíneo uveal ou no segmento posterior através da barreira hematorretiniana para a circulação sanguínea na coroide. As proteínas são depuradas preferencialmente pela câmara anterior devido às suas moléculas carregadas e com elevada massa molecular, que apresentam tempos de meia vida mais prolongados no vítreo (de dias a semanas) em comparação a moléculas capazes de transitar pelo caminho esclera-coroide-retina, as quais apresentam, geralmente, tempo de meia vida de poucas horas (EDINGTON; CONNOLLY; CHONG, 2017).

A cintilografia é um método que pode ser utilizado para avaliar qualitativamente, por meio de imagens, a depuração de um radiotraçador. Após a injeção intravítrea do radiotraçador produzido,  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a, foi possível acompanhar a sua permanência no olho ao longo do tempo, como mostrado na **Figura 24**. Pelas imagens é possível observar que praticamente não houve depuração do  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a ao longo das 6 h de acompanhamento, o que indica a permanência do complexo na cavidade vítrea.

Figura 24 – Imagens cintilográficas obtidas nos tempos de (A) 0, (B) 1 h, (C) 2 h, (D) 4 h e (E) 6 h após a injeção intravítrea de  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a em ratos Wistar.



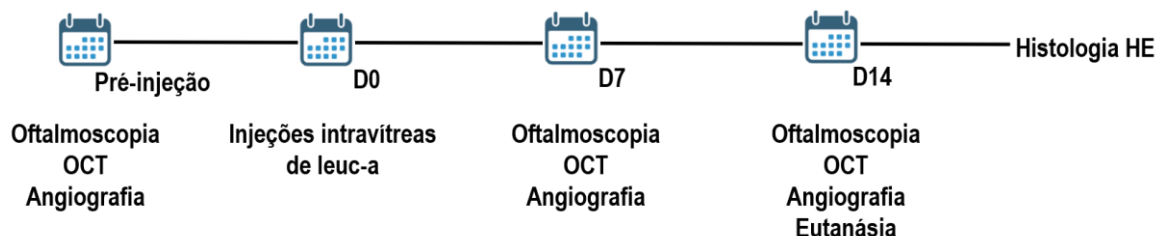
Apesar de ser apenas uma análise qualitativa, as imagens apresentadas na **Figura 24** sugerem que a longa permanência da leuc-a no vítreo implica em uma depuração lenta dessa proteína, de tal forma que indícios de toxicidade em estudos a longo prazo podem estar associados a esse comportamento. Entretanto, considerando-se que as oclusões de veia de retina podem se fazer recorrentes caso sejam consequência de doenças crônicas, esse perfil de depuração lenta pode ser desejável para um tratamento estendido. Estudos complementares de farmacocinética ocular são necessários para uma avaliação quantitativa da depuração da leuc-a após administração intravítrea.

**7 ETAPA EXPERIMENTAL 4: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E SEGURANÇA *IN VIVO* DA LEUC-A EM RATOS NÃO PIGMENTADOS WISTAR PELOS EXAMES DE TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA E ANGIOGRAFIA**

---

As etapas envolvidas no desenvolvimento dessa seção estão demonstradas na **Figura 25**.

**Figura 25 – Protocolo experimental da avaliação da toxicidade e segurança *in vivo* da leuc-a em ratos Wistar pelos exames de tomografia de coerência óptica e angiografia.**



## 7.1 Animais

Foram utilizados ratos machos não pigmentados da raça WISTAR, pesando entre 200 e 220 g, adquiridos no biotério central (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com ração e água *ad libitum*, com ciclo claro-escuro respeitado. Todos os procedimentos experimentais com animais foram realizados em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da ARVO. Os protocolos dos sistemas em avaliação foram aprovados pela CEUA da FUNED sob o protocolo 02/2018 (**ANEXO I**).

## 7.2 Materiais

- Leuc-a, produto natural purificado da serpente *Bothrops leucurus*, cedido pela FUNED.
- Cloridrato de de cetamina (Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio, Brasil).
- Cloridrato de xilasina (Anasedan<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio, Brasil).
- Cloridrato de tetracaína 1 %.
- Cloridrato de fenilefrina 0,1 % (Anestésico colírio<sup>®</sup>, Allergan, EUA).
- Mydriacyl<sup>®</sup> (Alcon, EUA).
- Fluoresceína 10 % (Citopharma, Brasil).
- Agulha ultra fine II 0,3 mm (BD, Brasil).
- Água ultrapura (Mili Q<sup>®</sup> plus, Merck Millipore, EUA).

- Lente Volk 90D (Welch Allyn, EUA).
- Microscópio óptico Axio Imager M2 (Zeiss, Alemanha).
- Tomógrafo de coerência óptica (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha).

### 7.3 Injeções intravítreas das soluções de leuc-a

A toxicidade da leuc-a sobre a retina foi avaliada após injeção intravítrea de soluções contendo a proteína previamente purificada, em olhos de ratos adultos machos da espécie Wistar. Foi utilizado o mesmo protocolo descrito no item **5.3**.

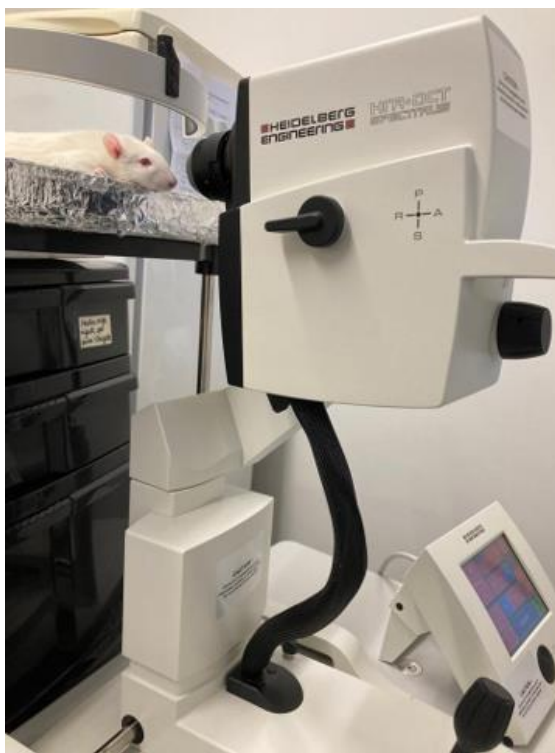
### 7.4 Avaliação clínica

Durante todo o período experimental, os olhos dos animais tratados foram avaliados clinicamente por inspeção ocular e oftalmoscopia binocular indireta (Omega 500 Binocular Indirect Ophthalmoscope, Heine Optotechnik, Herrsching, Alemanha), a fim de avaliar o fundo do olho dos animais e detectar possíveis alterações oculares. As imagens foram realizadas em modo vídeo por meio de uma câmera de *smartphone* (Iphone® SE – Apple®, Cupertino, CA, EUA), com consequente captura da imagem estática.

### 7.5 Tomografia de coerência óptica e angiografia por fluoresceína

As análises *in vivo* da retina por tomografia de coerência óptica (do inglês: *optical coherence tomography – OCT*) e por angiografia foram realizadas antes das injeções intravítreas, como controle, e sete e 14 dias após as injeções. Os animais foram anestesiados via injeção intraperitoneal de uma solução contendo xilazina 10 mg/kg e ketamina 90 mg/kg. Para as duas análises, foi usado um tomógrafo de coerência óptica de domínio espectral (Heidelberg Engineering, Alemanha), que foi adaptado para o uso animal. As pupilas dos animais foram dilatadas com colírio de tropicamida 1 % 15 min antes do início do exame, e os animais foram posicionados sobre um suporte de isopor adaptado ao tomógrafo (**Figura 26**).

Figura 26 – Adaptação do tomógrafo Heidelberg Engineering para uso animal.



Fonte: da autora.

Os quadrantes temporal, nasal e superior da retina foram analisados usando o nervo óptico e os vasos da retina como pontos de referência, sendo que cada escane foi registrado a um ângulo de 30 graus, com uma resolução óptica de 3,5 mm. Para a análise da angiografia, o colírio de tropicamida foi reaplicado e 300  $\mu$ L de uma solução a 10 % de fluoresceína foram injetados em uma das veias caudais do animal, utilizando agulha 0,30 x 13mm acoplada a uma seringa (**Figura 27**). A angiografia foi realizada logo após a tomografia, sob efeito da mesma anestesia e sedação, nos animais previamente selecionados.

**Figura 27 – Injeção intravenosa de uma solução a 10 % de fluoresceína, na cauda do rato para análise de angiografia.**



Fonte: da autora.

## **7.6 Avaliação histológica**

Para a avaliação histológica, no 14<sup>o</sup> dia de experimentação, os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico (270:30 cetamina/xilazina mg/kg) via intraperitoneal e os olhos preparados para a análise, conforme descrito no item **5.6**.

## **7.7 Resultados e discussão**

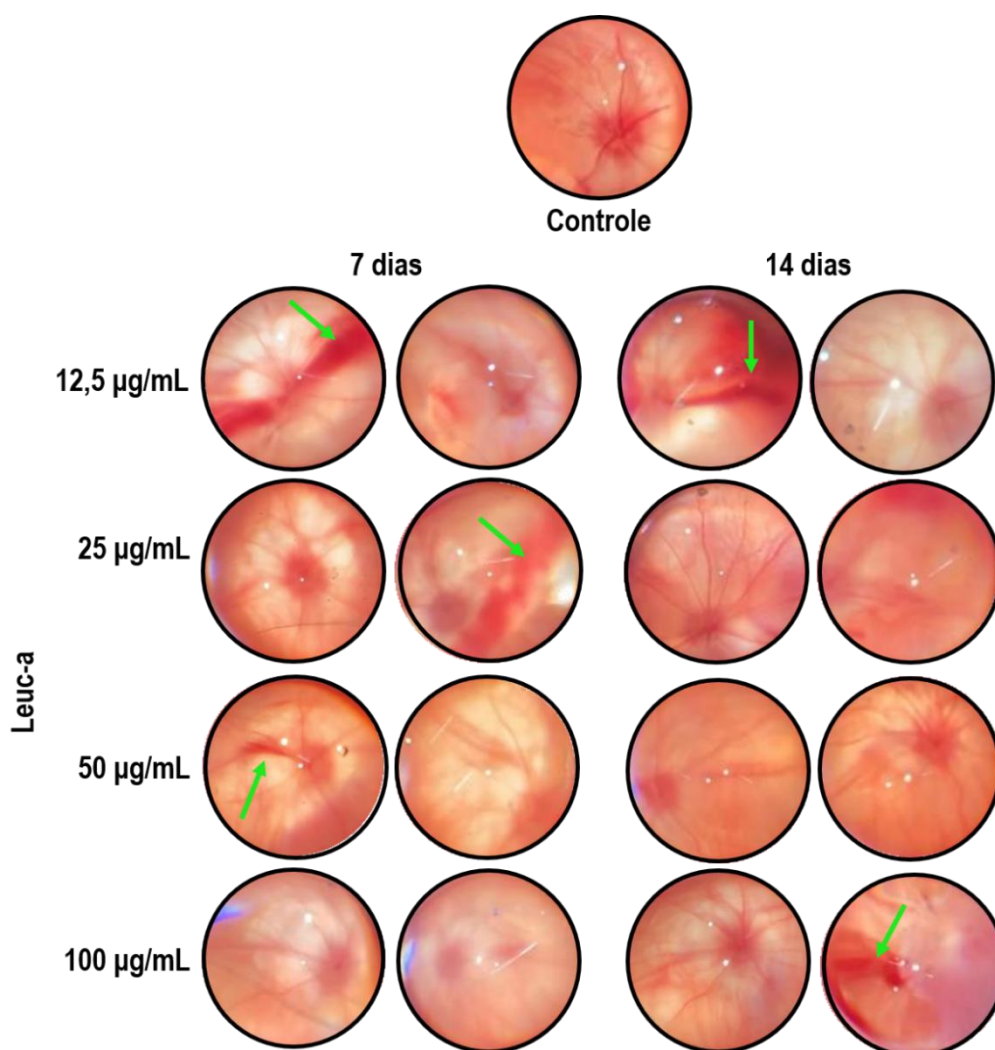
### *7.7.1 Avaliação clínica*

A análise do fundo de olho, ou oftalmoscopia direta, é um exame clínico que permite avaliar qualitativamente o aspecto macroscópico de uma região da retina e do nervo óptico. Atualmente, o uso de *smartphones* como oftalmoscópios vem sendo difundido devido à alta resolução das imagens e praticidade (PUJARI, 2021) .

O aspecto da retina foi avaliado pela análise do fundo do olho dos animais após as injeções intravítreas de PBS (controle) ou leuc-a. A **Figura 28** apresenta imagens

representativas obtidas para o controle e as diferentes doses testadas nos períodos de sete e 14 dias após as injeções.

**Figura 28 -** Imagens do fundo de olho de ratos Wistar nas doses de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL nos períodos pré injeção, 7 e 14 dias após as injeções intravítreas.



A imagem correspondente ao controle exibe uma retina saudável, com sua coloração natural e homogênea, vermelho-alaranjada, e vasos sanguíneos que se projetam radialmente a partir do nervo óptico; a cabeça do nervo óptico é macroscopicamente visível como um disco de cor rosada (BEHAR-COHEN et al., 2020).

Ao compararmos as imagens referentes à administração da leuc-a com o controle, podemos notar dois aspectos: o primeiro é que todas as doses testadas apresentaram algum sinal de toxicidade, seja no período de sete ou 14 dias, ou em ambos; o

segundo é que as lesões de 14 dias apresentaram uma melhora discreta em relação às de sete dias.

Ao contrário do resultado obtido no primeiro bloco de avaliação da toxicidade, neste caso, todas as doses apresentaram algum tipo de alteração, como indicado pelas setas verdes nas imagens. Essas alterações envolvem opacificação e, principalmente, eventos vasculares como vasodilatação e hemorragia. Foram expostas duas imagens representativas de cada dose com o intuito de mostrar que, para uma mesma dose, alguns animais apresentaram sinais de toxicidade, enquanto outros não, de modo que essa variação de resposta ocorreu em todos os grupos de tratamento. Além disso, há uma sugestão de que a toxicidade é mais intensa na fase aguda, com sete dias de exposição dos olhos dos animais à leuc-a.

De fato, outras questões podem ter relação com os eventos observados. A injeção intravítrea, quando não tão bem executada, pode lesionar a coróide e a retina, levando a uma hemorragia, como também pode provocar catarata, caso a agulha atinja o cristalino, além da possibilidade de instalação de processo inflamatório decorrente de uma infecção (GUPTA; SUN; SILVA, 2018). Existe, ainda, a possibilidade de perda de qualidade das imagens em decorrência da técnica e do aparelho empregados.

Diante de todas as variáveis, é desafiador concluir a origem das alterações apontadas, de modo que podemos considerar, também, uma combinação de fatores. No entanto, há fortes indícios da toxicidade da leuc-a, devido à intensidade com que esses eventos vasculares e hemorrágicos ocorreram, e que não aparentam ser dose-dependentes. Assim, buscamos, com os experimentos seguintes, investigar mais detalhadamente as características dessas lesões.

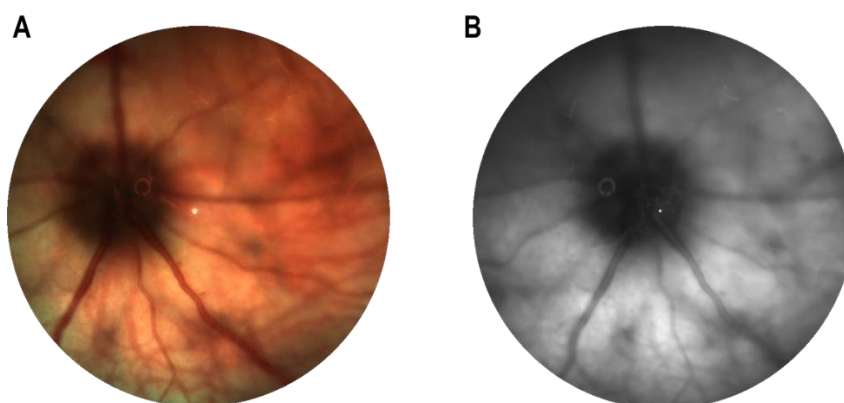
### *7.7.2 Fundo de olho, OCT e angiografia por fluoresceína*

Os resultados apresentados nesta seção são decorrentes de exames realizados em sequência e no mesmo equipamento. Após a abordagem dos fundamentos de cada exame, os resultados, que são complementares, serão apresentados e discutidos concomitantemente, a fim de tornar a interpretação das análises mais contundente.

O tomógrafo Heidelberg Engineering é um equipamento de alta tecnologia que possibilita a obtenção de fotografias de fundo de olho em diferentes comprimentos de onda, bem como a realização do exame de OCT e a angiografia por contraste.

As fotografias de fundo de olho obtidas por esse equipamento são capazes de replicar a visão da retina que o médico tem quando examina o paciente pela oftalmoscopia. Como os vasos sanguíneos absorvem mais energia do que os tecidos adjacentes, é possível mapear o fundo do olho de acordo com a intensidade da luz refletida. Para as nossas análises, utilizamos o modo de obtenção das imagens em cores e em infravermelho; enquanto as imagens em cores são mais fáceis de interpretar e mostram as características dos vasos e alterações vasculares, por meio das imagens em infravermelho é possível visualizar a circulação capilar de forma mais nítida, devido ao contraste maior (SPAIDE et al., 2018). Na **Figura 29** observamos o aspecto do fundo de um olho saudável.

**Figura 29 – Fotografia do fundo do olho de um rato Wistar saudável, utilizando o OCT, sendo (A) em cores e (B) em infravermelho.**

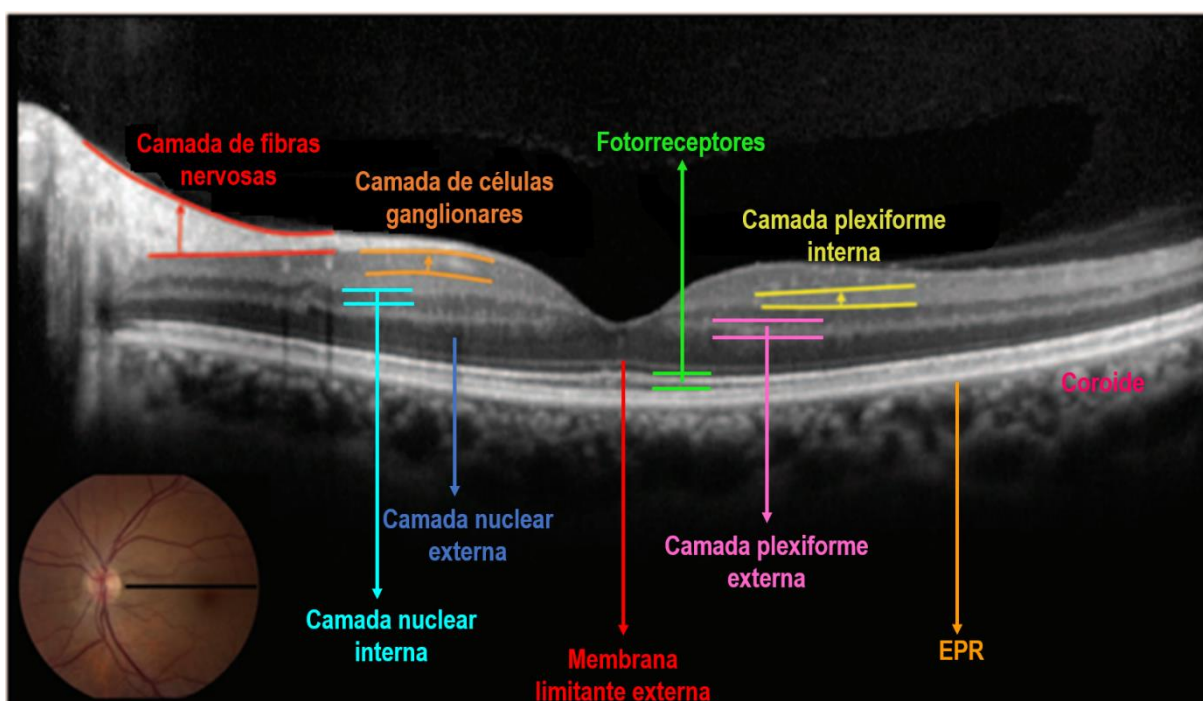


**Fonte: da autora.**

A OCT é uma técnica não invasiva que produz secções transversais e bidimensionais da retina, com alta resolução. Esse exame tem alto valor na oftalmologia, uma vez que ele possibilita o diagnóstico precoce de distúrbios ou alterações oculares e, também, do sistema nervoso central (EUGENIA et al., 2018), podendo fornecer

informações quantitativas, como espessura das camadas da retina, ou qualitativas, como lesões e aspectos morfológicos (MICIELI; NEWMAN; BIOUSSE, 2019). A **Figura 30** demonstra a disposição das camadas de uma retina saudável pela OCT.

**Figura 30 – Principais camadas de uma retina saudável evidenciadas em uma imagem de OCT da região macular.**



Fonte: adaptado de (MICIELI; NEWMAN; BIOUSSE, 2019).

A angiografia é um exame de imagem invasivo também bastante útil no diagnóstico precoce de distúrbios vasculares no olho, uma vez que a injeção sistêmica de um contraste permite avaliar detalhadamente e com alta resolução as características macro e microvasculares do fundo do olho, apontando alterações, como obstruções de vasos, aneurismas, isquemia e hemorragia (CAI et al., 2020; JIANG et al., 2018).

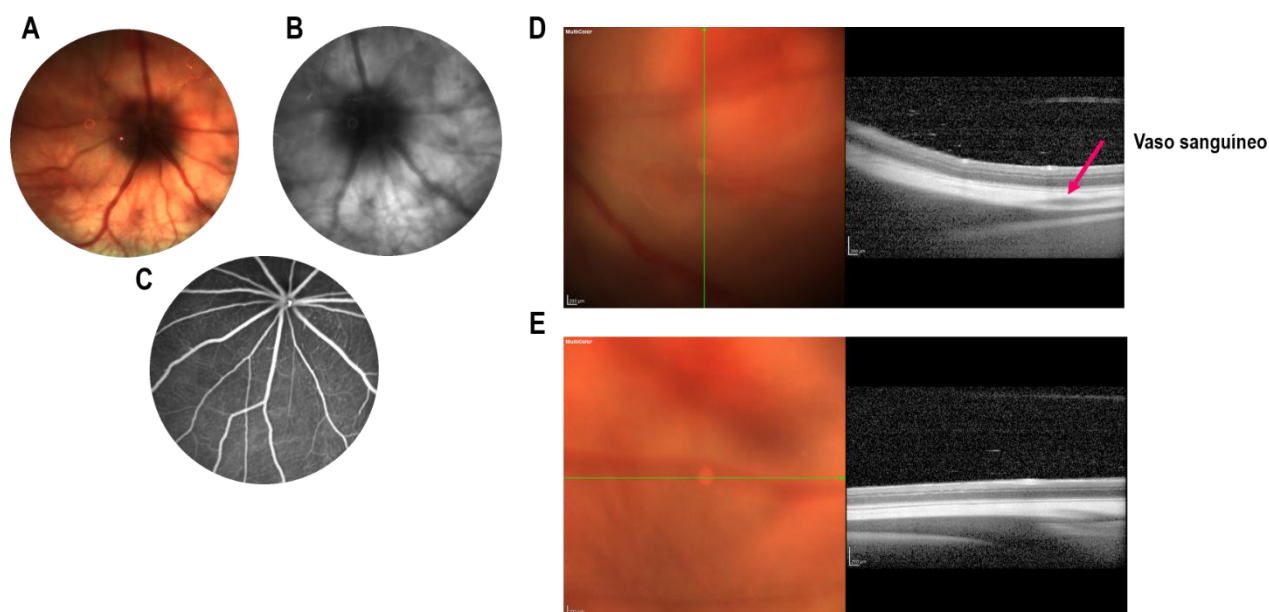
A fluoresceína e a indocianina verde (ICG) são os contrastes mais utilizados na angiografia ocular. A fluoresceína é uma molécula hidrossolúvel, com pico de absorção em 490 nm, que se liga rapidamente às proteínas plasmáticas e permeia pelas paredes vasculares. O tamanho molecular desse composto impede a sua passagem através das junções endoteliais dos vasos sanguíneos da retina, permitindo

uma difusão rápida nos compartimentos de fluidos (S et al., 2021). Já a ICG é um corante de iodeto fluorescente, relativamente atóxico, com pico de absorção em 832 nm. A elevada taxa de ligação a proteínas plasmáticas de alto peso molecular faz com que a ICG permaneça no espaço intravascular, sem conseguir penetrar nas fenestrações capilares, o que a torna ideal para avaliar a perfusão tecidual da coroide. Como a trama capilar da retina não possui fenestrações, os contrastes não extravasam dos vasos para os tecidos adjacentes, enquanto, na coroide, essas substâncias ficam livres para transitarem entre os compartimentos intra e extravasculares (BRANCATO; TRABUCCHI, 1998; REINHART et al., 2016). Nos experimentos desta seção foi usada apenas a fluoresceína por razões de disponibilidade no momento do experimento.

De uma maneira geral, assim como observado no exame de oftalmoscopia direta, animais de todos os grupos de desafio com a leuc-a apresentaram alterações predominantemente agudas ao serem comparadas as análises entre sete e 14 dias.

Na **Figura 31** estão imagens de fundo de olho, angiografia e OCT de um animal controle.

**Figura 31** – Imagens de fundo de olho em (A) cores e em (B) infravermelho; (C) angiografia por fluoresceína e (D) e (E) OCT do olho de um rato Wistar controle.



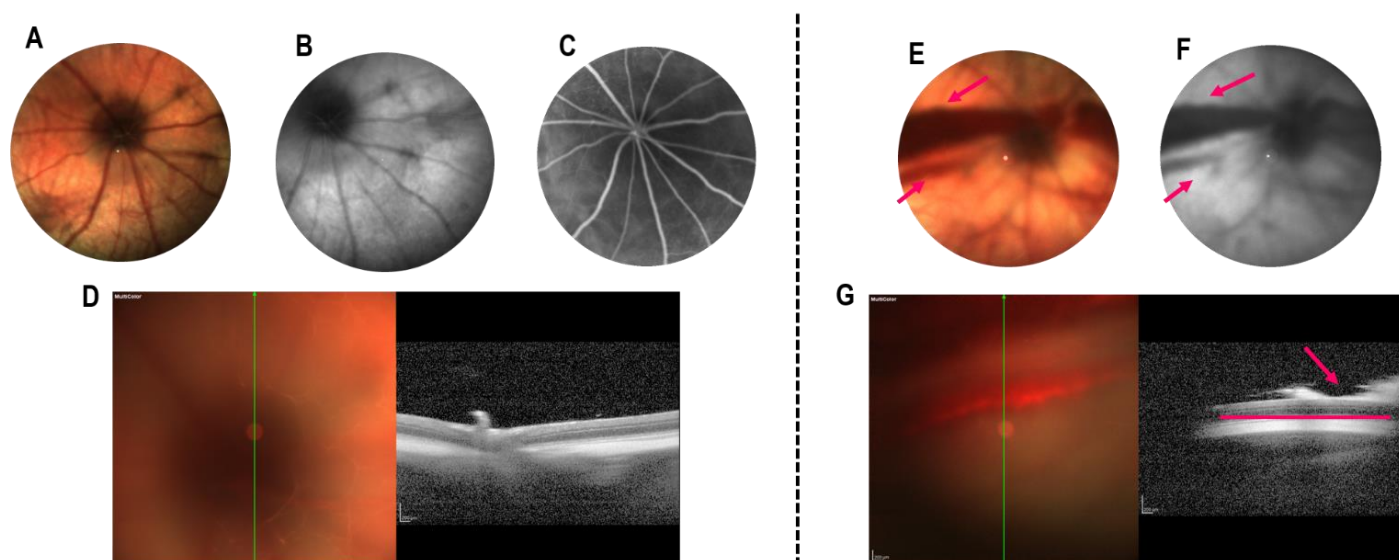
A **Figura 31** mostra o fundo de olho desse animal (A) em cores e em (B) infravermelho, revelando um aspecto saudável, com vasculatura íntegra, de modo que as veias e artérias saem radialmente do disco óptico, enquanto a microvasculatura é mais fina e tortuosa e se espalha como ramificações dos vasos principais. A coloração natural do fundo do olho pode variar entre as diferentes espécies e etnias humanas, sendo que ela é um reflexo da concentração de melanina presente no RPE e nos melanócitos da coroide, e de hemoglobina nos vasos retinianos e coroidais (RAMSAMY; ARUNAKIRINATHAN; COOMBES, 2017). A imagem de angiografia por fluoresceína (**Figura 31-C**) revela os detalhes do aspecto e da circulação da retina, reproduzindo as características vistas no exame de fundo de olho, e, pela OCT, é possível observar as camadas da retina, organizadas e íntegras, como apontado nas **Figuras 31-D e E**. Os três resultados em conjunto fazem um mapeamento detalhado das condições fisiológicas da retina.

Dentre as diversas alterações e lesões que podem ocorrer na retina, podemos citar algumas mais comuns, como obstrução de um vaso sanguíneo, isquemia, hemorragia, presença de infiltrado inflamatório e descolamento seroso da retina, no qual não há

perda da integridade do tecido. Algumas dessas alterações foram observadas nos animais desafiados com a leuc-a, em diferentes doses. Em todos os grupos de tratamento houve animais saudáveis, sem alterações após a injeção, e animais com algum tipo de alteração clínica, de tal forma que serão apresentadas nas figuras seguintes imagens representativas de animais saudáveis e acometidos dentro de cada grupo.

A **Figura 32** contém imagens referentes às análises do grupo um, em que os animais receberam a dose de 12,5 µg/mL de leuc-a.

**Figura 32 - Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (E) cores e em (B) e (F) infravermelho; (C) angiografia por fluoresceína e (D) e (G) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo um, sete dias após as injeções intravítreas de leuc-a.**

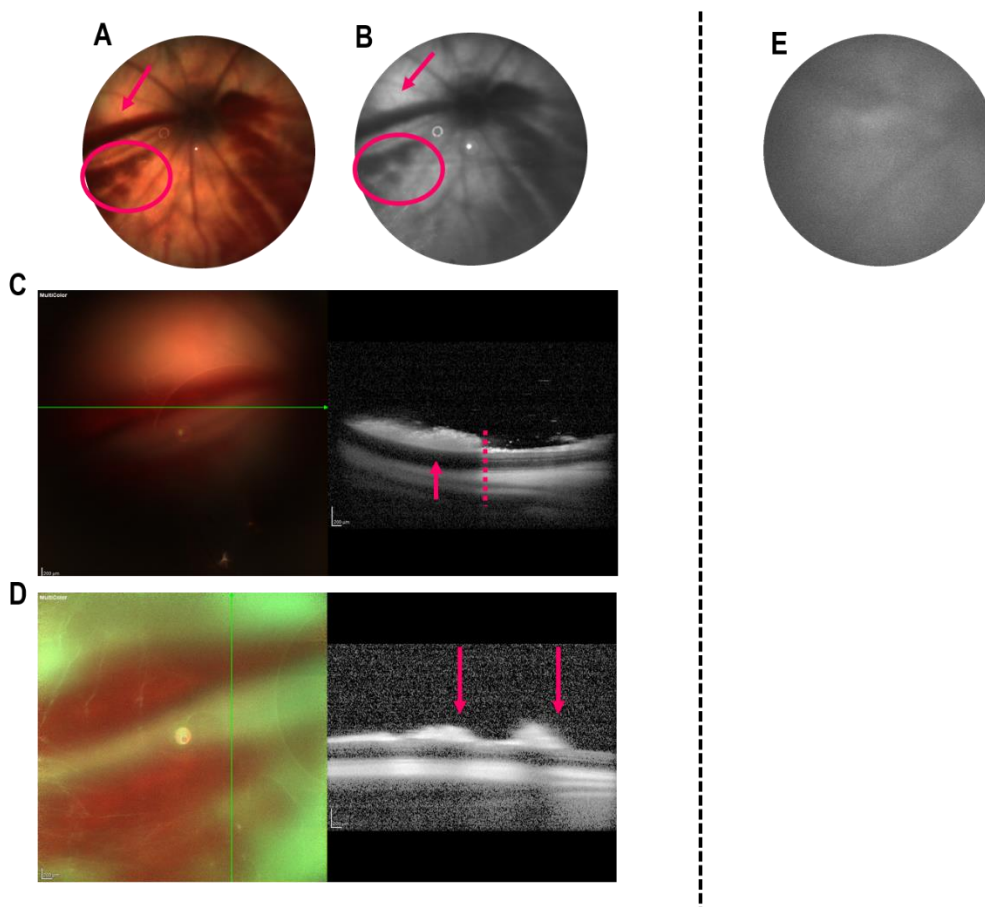


As **Figuras A-D** mostram um animal saudável desse grupo, sem qualquer alteração retiniana em todas as análises, sendo que as imagens se assemelham àquelas do animal controle. Já nas **Figuras 32-E e F**, com sete dias, observamos uma vasodilatação acentuada, apontada pelas setas de cor rosa, sendo um possível foco de hemorragia. Na imagem de OCT (**Figura 32-G**), a linha rosa destaca, logo acima, a camada nuclear externa da retina, que se encontra disforme e danificada. A seta indica um possível descolamento parcial da membrana hialoide do vítreo, que ocorre

quando a parte posterior do vítreo, em contato íntimo com a retina, descola-se e aparenta estar “flutuando” na cavidade vítrea.

A **Figura 33** representa o mesmo animal 14 dias após a administração da leuc-a.

**Figura 33 –** Imagens representativas de fundo de olho em (A) cores e em (B) e (D) infravermelho, e (C) e (E) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo um, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.

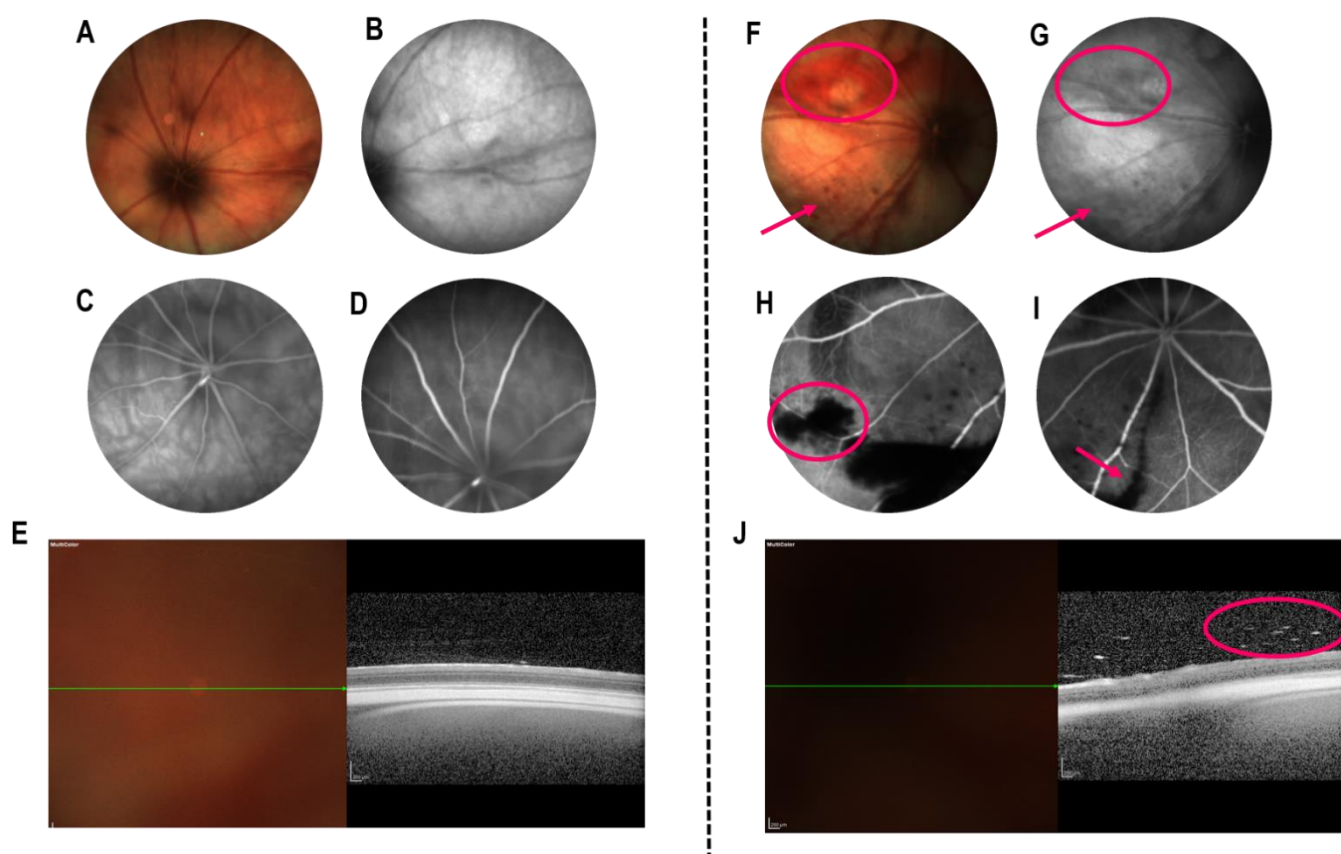


Houve uma redução significativa do calibre do vaso sanguíneo apontado pelas setas (**Figuras 33-A e B**), mas, em contrapartida, outros focos de hemorragia surgiram nas periferias da retina. Na **Figura 33-C**, a linha tracejada delimita o ponto em que observamos a destruição da camada nuclear externa (à esquerda da linha); além disso, a **Figura 33-D** mostra uma região da retina lesionada e praticamente descélularizada, sem camadas definidas e também com o descolamento hialóide do vítreo, apontado pelas setas.

Devido ao estado do olho do outro animal, não foi possível realizar as análises de imagem correspondentes de 14 dias (**Figura 33-E**).

A **Figura 34** contém imagens referentes às análises do grupo dois, em que os animais receberam a dose de 25 µg/mL de leuc-a.

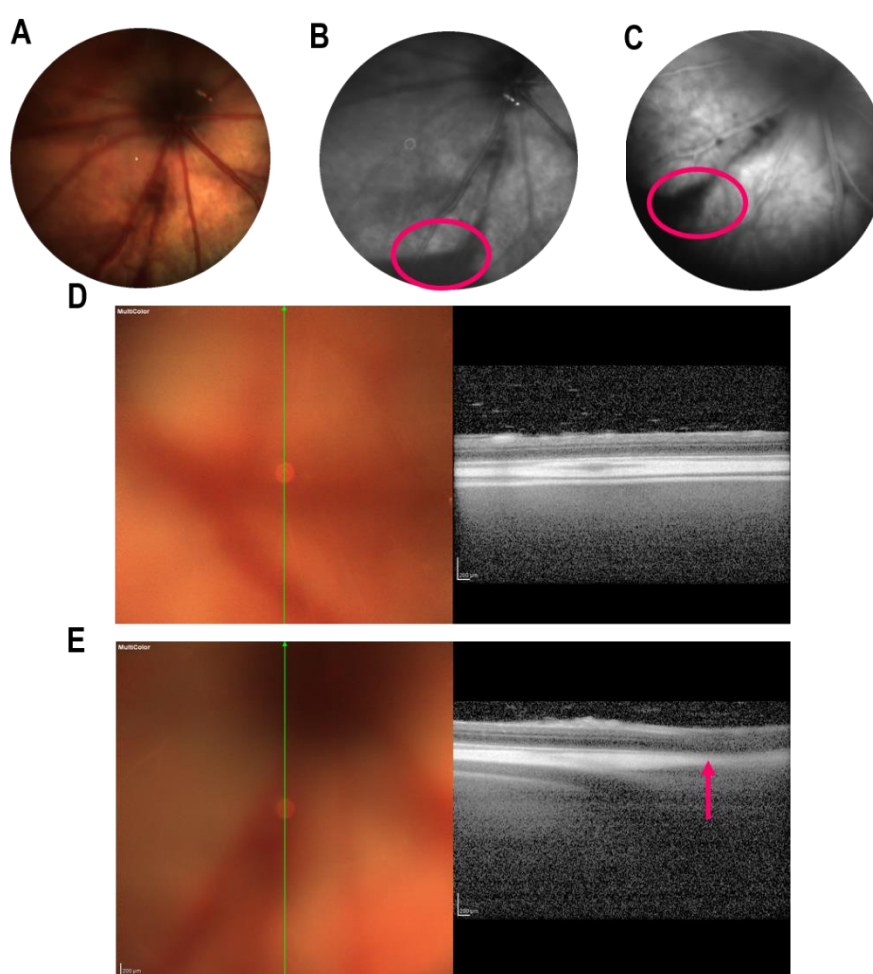
**Figura 34 –** Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (F) cores e em (B) e (G) infravermelho; (C), (D), (H) e (I) angiografia, e (E) e (J) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo dois, sete dias após as injeções intravítreas de leuc-a.



Assim como no grupo anterior, esse grupo também apresentou animais que não tiveram alterações retinianas, como mostrado pelas **Figuras 34-A-E**. Por outro lado, as imagens de fundo de olho de um outro animal (**Figuras 34-F e G**) têm regiões de hemorragia e petéquias destacadas; a angiografia (**Figuras 34-H e I**) evidencia regiões intensas de hemorragia, que aparecem como manchas pretas. Da mesma forma, a OCT (**Figura 34-J**) revela a presença de infiltrado inflamatório na retina, representado por pequenos pontos brancos, que estão em destaque.

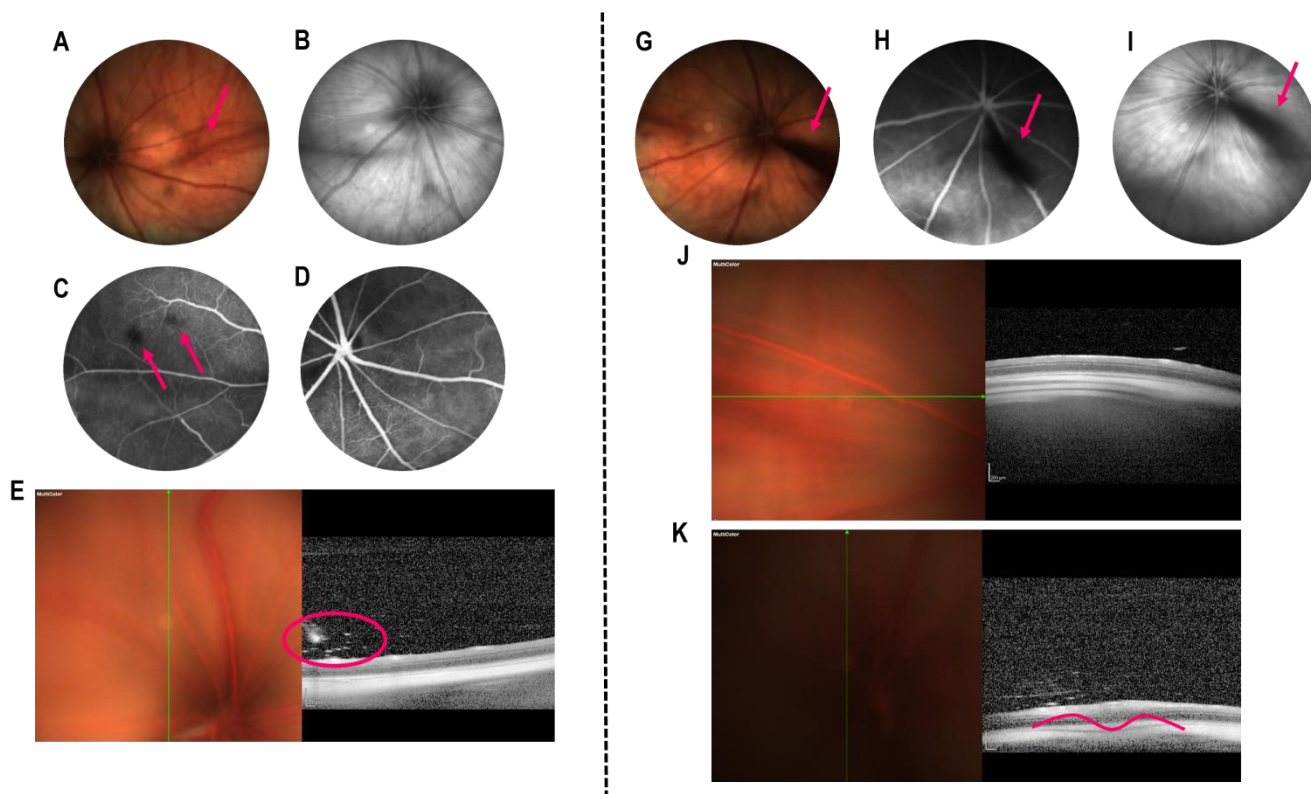
Após 14 dias, apesar da intensidade ser menor, os focos de hemorragia ainda são observados tanto pelo fundo do olho (**Figuras 35-A e B**), quanto pela angiografia (**Figura 32-C**). Pela OCT destacamos o infiltrado inflamatório (**Figura 35-D**) e perda de definição e redução da espessura das camadas da retina, como indicado pela seta (**Figura 35-E**).

**Figura 35** – Imagens representativas de fundo de olho em (A) cores e em (B) infravermelho; (C) angiografia e (D) e (E) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo dois, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.



Na **Figura 36** estão representadas as análises do grupo três, no qual os animais receberam a dose de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de leuc-a.

**Figura 36** – Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (G) cores e em (B) E (H) infravermelho; (C), (D) e (I) angiografia, e (E), (J) e (K) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo três, sete dias após as injeções intravítreas de leuc-a.

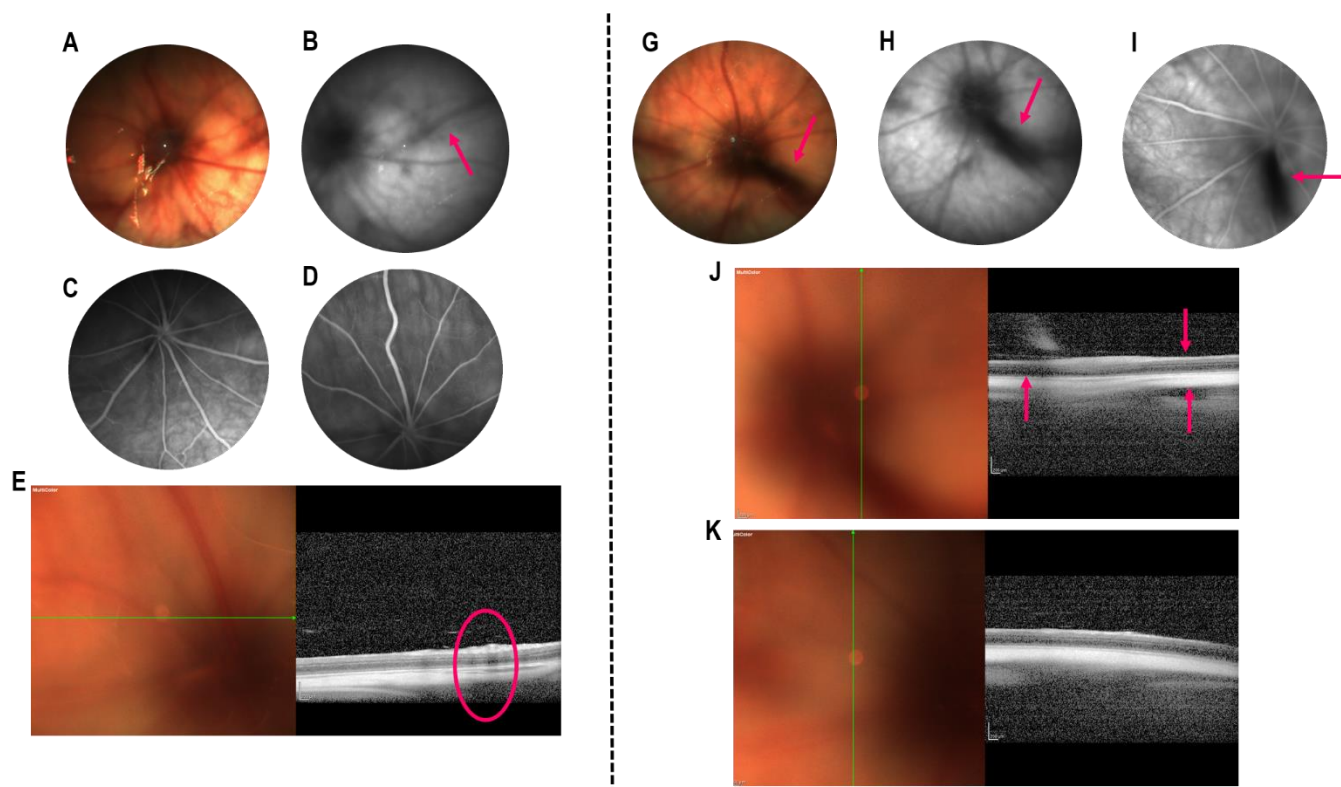


Pela angiografia de sete dias (**Figuras 36-C e D**), não percebemos alterações vasculares em nenhuma das imagens; no entanto, os pontos mais escuros, indicados pelas setas, são áreas de hipofluorescência, que pode ter diferentes causas. Segundo Brancato e colaboradores (1998), esse fenômeno pode estar relacionado à ausência da fluoresceína região como consequência da falta de perfusão ou ausência de tecido (BRANCATO; TRABUCCHI, 1998). Uma outra explicação poderia ser a presença de hemorragia sob o EPR, que bloqueia a fluorescência. A OCT (**Figura 36-E**) revela focos de infiltrado inflamatório no tecido. Já nas **Figuras 36-G-I**, também de sete dias, está evidenciado um vaso hiperdilataado, com indícios de hemorragia, próximo ao nervo óptico. Isso refletiu também nas imagens de OCT (**Figura 36-K**), em que, além das células inflamatórias, há irregularidades nas camadas retinianas.

Uma imagem obtida nas análises de 14 dias (**Figura 37**) indica um descolamento seroso da retina, no qual não há perda da integridade (rasgo) do tecido, podendo ser

causado, por exemplo, por inflamações ou acúmulo de fluido sob a retina (CHRONOPOULOS et al., 2021; VAN DIJK; BOON, 2021).

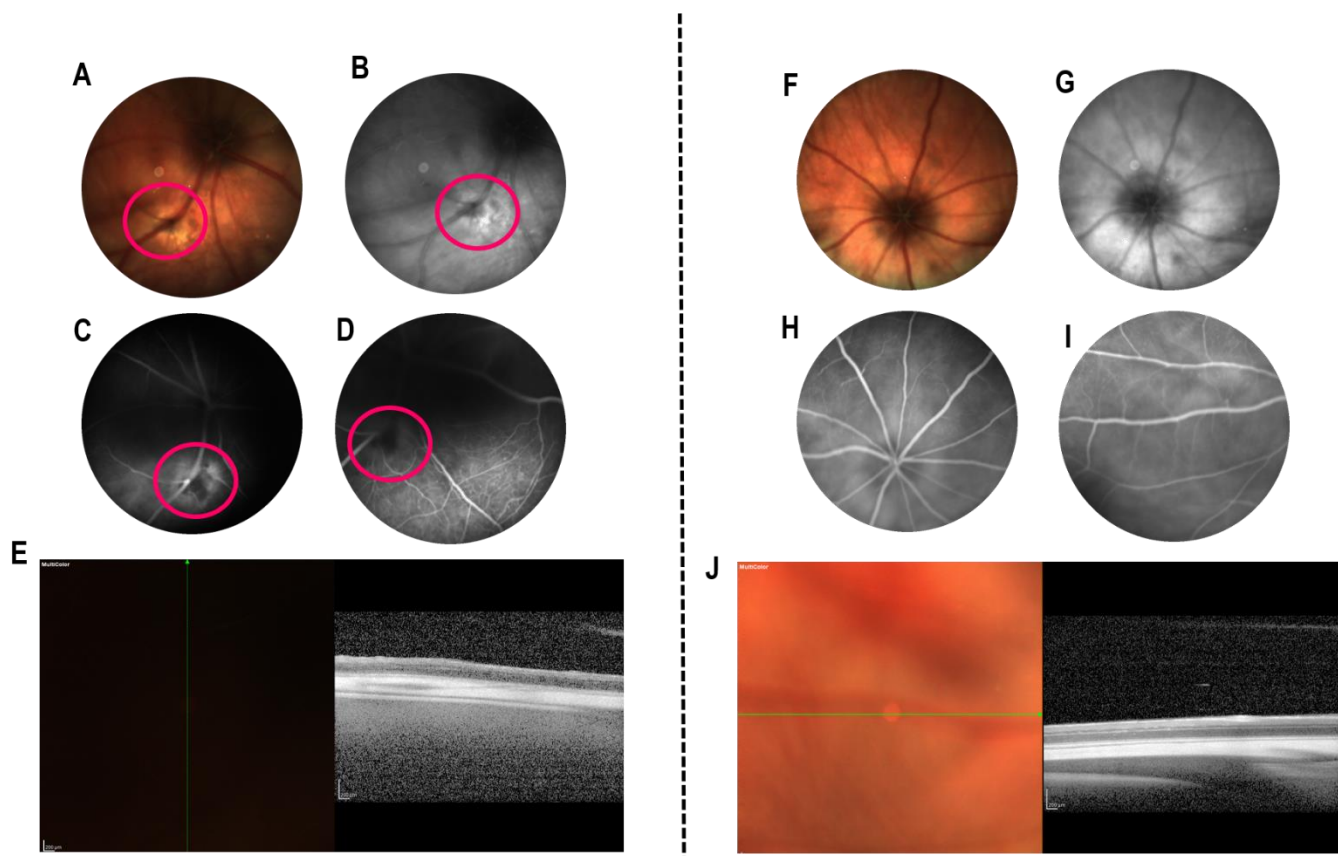
**Figura 37 –** Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (G) cores e em (B) e (H) infravermelho; (C), (D) e (I) angiografia, e (E), (J) e (K) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo três, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.



As **Figuras 37-G-I** mostram que o vaso dilatado e hemorrágico permanece, enquanto um corte de OCT que passa pelo disco óptico (**Figura 37-J**) revela um tecido bastante alterado e danificado, com regiões de descelularização e achatamento.

Por fim, a **Figura 38** mostra os resultados do grupo quatro, no qual os animais receberam a dose de 100 µg/mL de leuc-a.

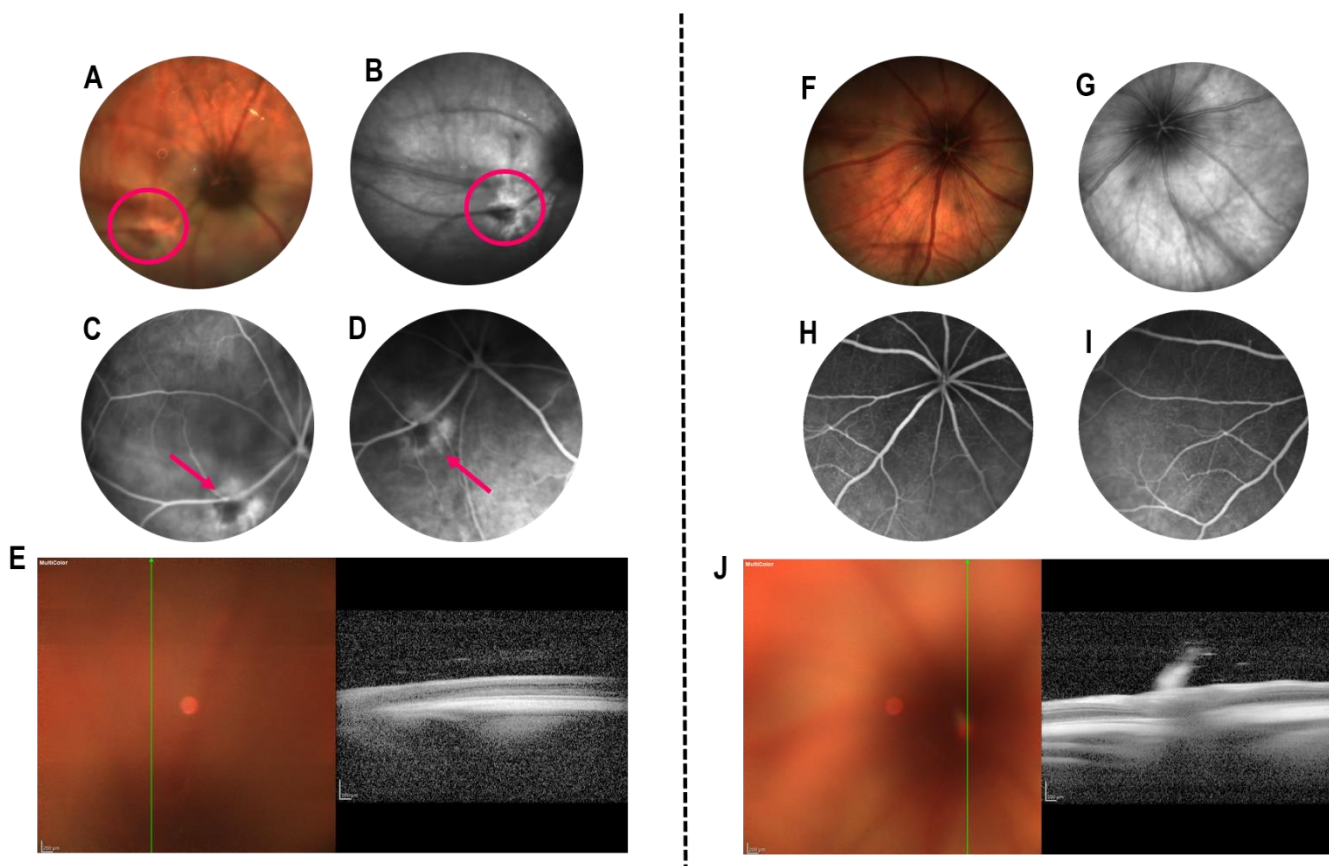
**Figura 38** – Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (F) cores e em (B) e (G) infravermelho; (C), (D), (H) e (I) angiografia, e (E) e (J) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo quatro, sete dias após as injeções intravítreas de leuc-a.



Nas **Figuras 38-A e B** estão destacados eventos hemorrágicos que, pela angiografia (**Figuras 38-C e D**), aparecem como um ponto de hipofluorescência. A imagem de OCT (**Figura 38-E**) indica uma perturbação das camadas mais internas da retina, que se apresentam degeneradas.

Com 14 dias os eventos hemorrágicos se mantiveram, mas com um extravasamento maior da fluoresceína sob o ponto de bloqueio do fluxo sanguíneo. Ao contrário do esperado, alguns animais que receberam a dose mais alta da leuc-a também não apresentaram alterações significativas na retina como sinal de toxicidade, como demonstrado na **Figura 39**.

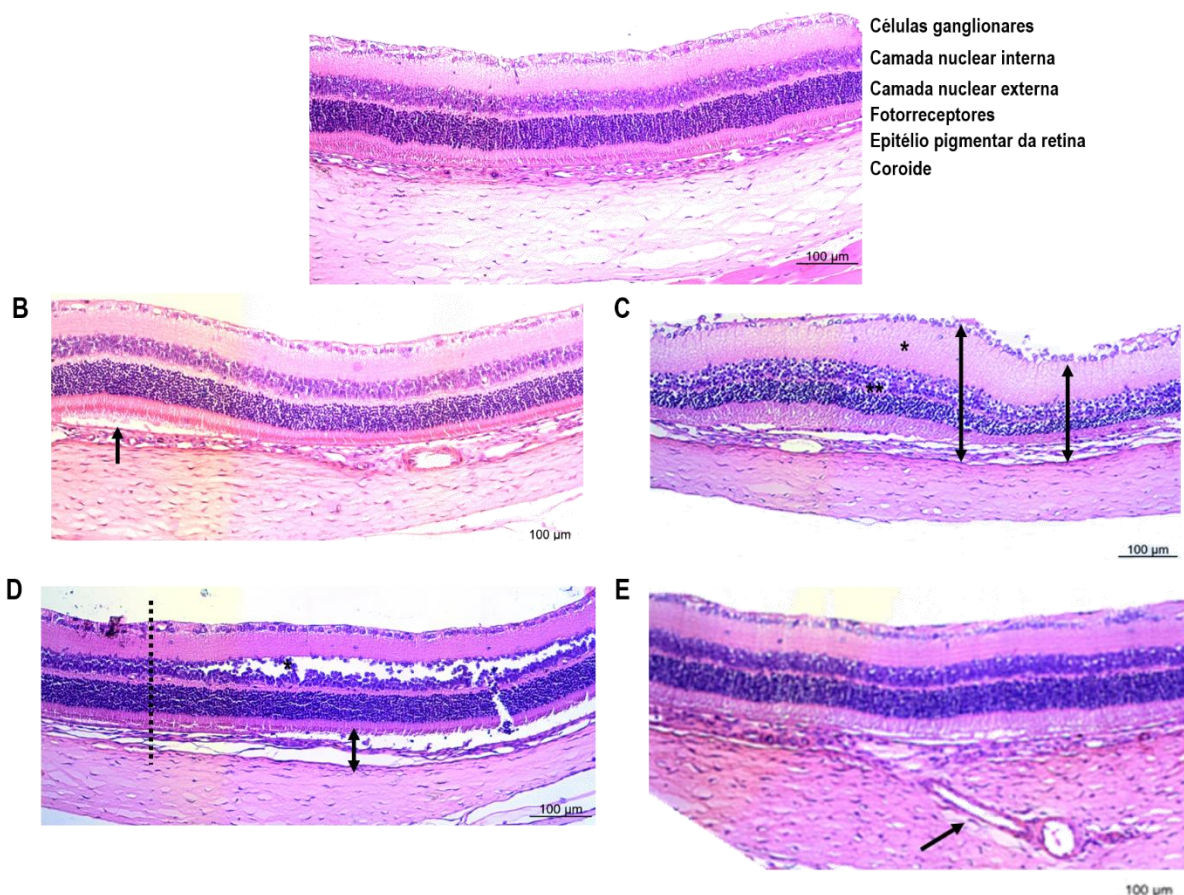
**Figura 39** – Imagens representativas de fundo de olho em (A) e (F) cores e em (B) e (G) infravermelho; (C), (D), (H) e (I) angiografia, e (E) e (J) OCT dos olhos de ratos Wistar do grupo quatro, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.



### 7.7.3 Avaliação histológica

A avaliação da arquitetura da retina foi realizada a partir de cortes histológicos, cujas imagens representativas estão apresentadas na **Figura 40**.

**Figura 40-** Microscopia óptica de retina de rato corada por HE no tempo de 14 dias após a injeção intravítrea de (A) veículo; (B) Leuc-a 12,5 µg/mL; (C) Leuc-a 25 µg/mL; (D) Leuc-a 50 µg/mL; (E) Leuc-a 100 µg/mL.



Assim como observado nas análises clínicas, todos os quatro grupos de tratamento apresentaram tanto regiões da retina saudáveis quanto regiões danificadas ou que reproduzem os resultados anteriores. Na **Figura 40-B**, correspondente ao grupo um (12,5 µg/mL de leuc-a), apesar das camadas celulares se mostrarem íntegras e organizadas, a seta aponta para uma região da retina em que houve um descolamento da camada de células fotorreceptoras do EPR. A **Figura 40-C**, representativa do grupo dois (25 µg/mL de leuc-a), é marcada por variações de espessura das camadas retinianas, principalmente a camada plexiforme interna, assinalada com um asterisco, e a camada nuclear externa, assinalada com dois asteriscos. Isso está associado a uma arquitetura desorganizada. Pela histologia, o grupo três (50 µg/mL de leuc-a) apresentou um alto grau de degeneração (**Figura 40-D**), em que a linha pontilhada delimita o início de uma completa destruição da camada nuclear interna da retina, assinalada com um asterisco. Além disso, houve descolamento da camada fotorreceptora em relação ao EPR e deste em relação à coroide. A **Figura 40-E**,

representante do grupo quatro (100 µg/mL de leuc-a), apresenta a arquitetura da retina preservada, mas com um vaso de característica anormal, indicado pela seta. Esse vaso, que se encontra na coroide, é mais calibroso e com o lúmen maior que o normal.

**8 ETAPA EXPERIMENTAL 5: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MAIOR DOSE TESTADA DA LEUC-A *IN VIVO* EM RATOS PIGMENTADOS LONG EVANS PELOS EXAMES DE OCT E ANGIOGRAFIA**

---

Os experimentos contidos nessa seção foram realizados durante o período de doutorado sanduíche em Paris, França, no laboratório de *Physiopathologie des maladies oculaires: innovations thérapeutiques*, sob orientação da Profa. Dra. Francine Behar-Cohen. Cronologicamente, essa etapa ocorreu logo após os experimentos da seção 5, em que apenas a dose mais alta, de 100 µg/mL de leuc-a apresentou toxicidade. Assim, optamos por avaliar apenas essa dose, de modo a investigar as causas possíveis de toxicidade e hemorragia oculares. As etapas envolvidas no desenvolvimento dessa seção estão demonstradas na **Figura 41**.

**Figura 41 – Protocolo experimental da avaliação da toxicidade da maior dose testada da leuc-a *in vivo* em ratos Long Evans pelos exames de OCT e angiografia.**



## 8.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Long Evans, pesando aproximadamente 250 g, adquiridos no *Centre d'Exploration Fonctionnelle* (CEF) do *Centre de recherche des Cordeliers* (Paris, França), onde essa etapa experimental foi realizada. Os animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com ração e água *ad libitum*, com ciclo claro-escuro respeitado. Todos os procedimentos experimentais com animais foram realizados em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da ARVO. Os protocolos dos sistemas em avaliação foram aprovados pelo *Réglementation et le Dispositif Éthique de l'expérimentation Animale* sob protocolo C03-320 (**ANEXO II**).

## 8.2 Materiais

- Leuc-a, produto natural purificado da serpente *Bothrops leucurus*, cedido pela FUNED.
- Cloridrato de de cetamina (Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio, Brasil).
- Cloridrato de xilasina (Anasedan<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio, Brasil).
- Cloridrato de tetracaína 1%.
- Cloridrato de fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio<sup>®</sup>, Allergan, EUA).
- Mydriacyl<sup>®</sup> (Alcon, EUA).
- Fluoresceína 10 % (Fluocyne<sup>®</sup>, SERB, França).
- Indocianina verde (SERB, França).
- Agulha ultra fine II 0,3 mm (BD, Brasil).
- Água ultrapura (Mili Q<sup>®</sup> plus, Merck Millipore, EUA).
- Anticorpo NG-2 132.98 - sc33666 (Santa Cruz Biotechnology, França).
- Anticorpo CD31 TLD-3A12 (BioRad, EUA).
- Anticorpo IBA-1 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, EUA).
- Microscópio de fluorescência AXIO SCAN Z1 (Zeiss<sup>®</sup>, EUA).
- Tomógrafo de coerência óptica (Micron III<sup>®</sup>, Phoenix Research Labs, EUA).

## 8.3 Injeções intravítreas das soluções de leuc-a

As injeções intravítreas foram realizadas em olhos de ratos adultos machos da espécie não pigmentada Long Evans, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente (tópico 8.1.2.1). Foram utilizados 12 animais, divididos entre os grupos controle e tratamento (n=6), sendo que os animais receberam nos olhos direitos injeções de 5 µL da solução de 100 µg/mL de leuc-a, ou 5 µL de PBS pH 7,4 estéril para os animais controle. O cálculo da concentração de trabalho também foi o mesmo já descrito.

#### 8.4 OCT e angiografia por fluoresceína e indocianina verde

As análises *in vivo* da retina por OCT foram realizadas conforme descrito no procedimento anterior (tópico 8.1.2.2). Para a análise da angiografia, o colírio de tropicamida foi reaplicado, sendo que foram injetados 100 µL de uma solução a 10 % de fluoresceína (Fluocyne, SERB, França) e 200 µL de indocianina verde (25 mg/10 mL), SERB, França) em uma das veias caudais do animal, utilizando agulha 0,30 x 13 mm acoplada a uma seringa. A angiografia foi realizada logo após a tomografia, sob efeito da mesma anestesia e sedação, em todos os animais.

#### 8.5 Imunohistoquímica em montagens planas da retina

No 28º dia de experimentação, após as análises de OCT e angiografia, os olhos dos animais foram enucleados e fixados em paraformaldeído 4 % por 1 h antes da dissecação dos olhos. Nesse processo, as neuroretinas foram recuperadas e seccionadas parcialmente em quatro pontos, como se formassem uma flor de quatro pétalas, a fim de ficarem planas. Após passarem pelos processos de lavagem e bloqueio, as neuroretinas foram incubadas em 100 µL do anticorpo primário *overnight*, a 4 °C. Em seguida, após as lavagens, foram adicionados 100 µL dos anticorpos secundários nas suas respectivas amostras, com uma diluição de 1:200, por 3 h sob agitação. Mais uma vez as amostras foram lavadas e cada neuroretina foi posicionada entre duas lamínulas antes de ser colocada sobre uma lâmina para análise microscópica. A relação dos anticorpos utilizados está exposta no **Quadro 3**.

**Quadro 3 – Relação dos anticorpos utilizados para avaliação das neuroretinas de ratos Long Evans pela técnica de imuno-histoquímica.**

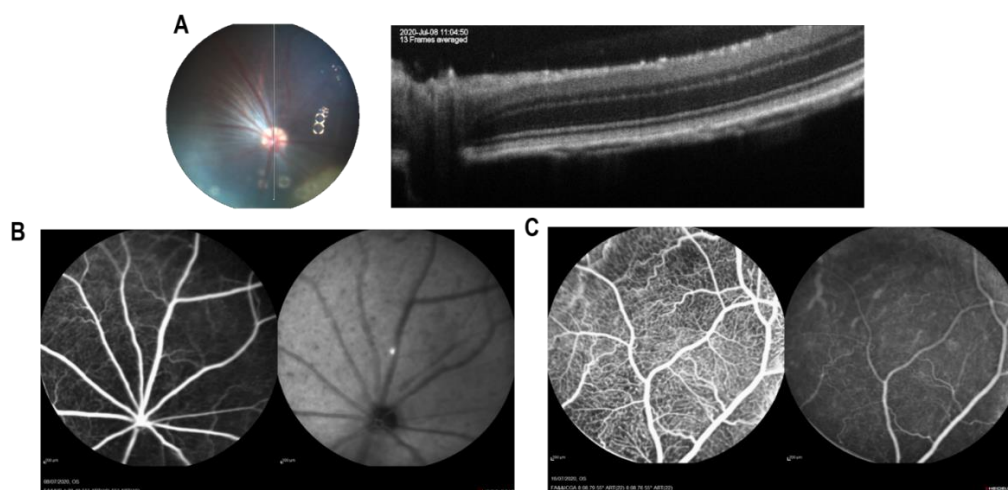
Anticorpo primário	Alvo biológico	Anticorpo secundário	Cor
IBA-1	Micróglia e macrófagos	Anti-coelho	Violeta
NG-2	Pericitos, lâmina basal do endotélio dos capilares	Anti-camundongo	Vermelho
CD-31	Células endoteliais, plaquetas e leucócitos	Anti-rato	Verde

## 8.6 Resultados e discussão

### 8.6.1 OCT e angiografia por fluoresceína e indocianina verde

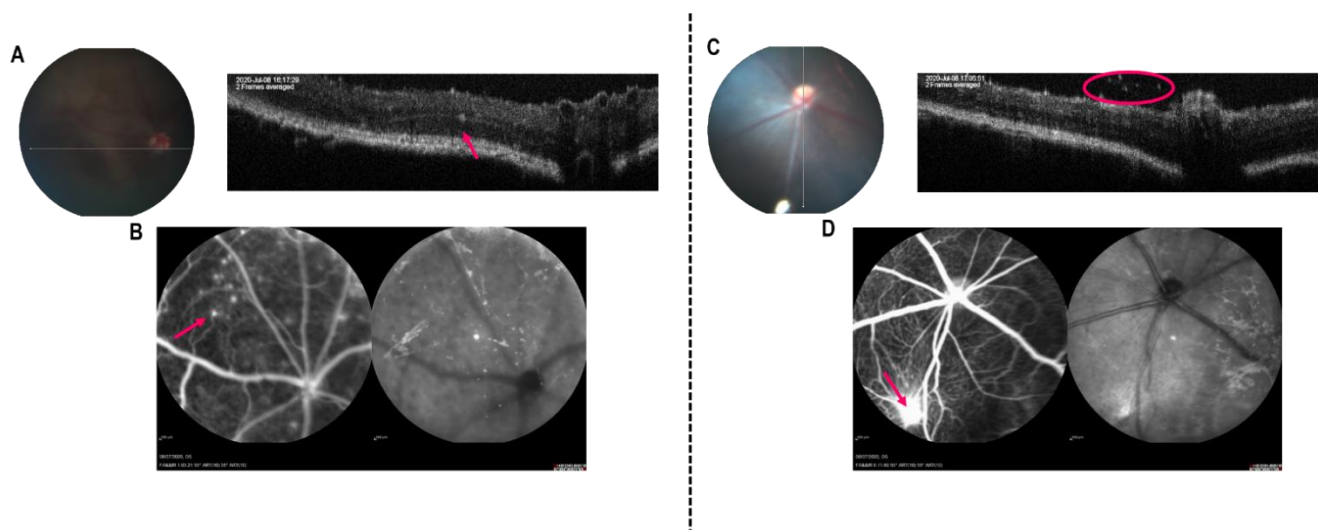
A **Figura 42** representa um animal controle. A OCT (**Figura 42-A**) destaca todas as camadas da retina, que se apresentam bem delimitadas e íntegras. As imagens de angiografia (**Figura 42-B**) revelam a vasculatura característica de um olho saudável e evidenciam (**Figura 42-C**) a microvasculatura da coroide.

**Figura 42 – Imagens representativas de (A) OCT e (B) e (C) angiografia do olho de um rato Long Evans controle.**



O período de sete dias também se mostrou com maior toxicidade nesse estudo, e a **Figura 43** mostra imagens representativas dos resultados.

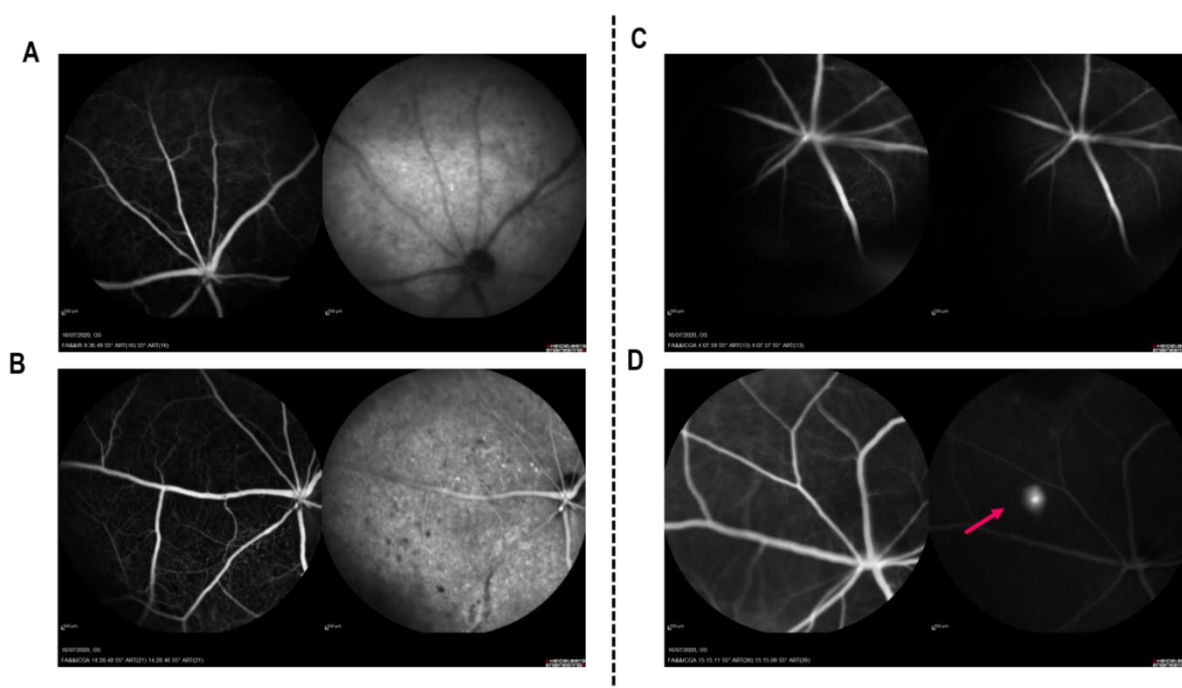
**Figura 43** – Imagens representativas de (A) e (C) OCT e (B) e (D) angiografia dos olhos de ratos Long Evans, sete dias após as injeções intravítreas de leuc-a.



A **Figura 43-A**, que possui baixa qualidade devido ao estado clínico em que o olho se encontrava, mostra camadas celulares com pouca delimitação, além de um descolamento de retina, indicado pela seta; já a outra imagem de OCT (**Figura 43-C**) destaca um foco de infiltrado inflamatório. Na angiografia (**Figura 43-B**) a seta aponta para pequenos pontos de hiperfluorescência, assim como na **Figura 43-D**, em que há um foco hiperfluorescente em um vaso, podendo indicar neovascularização. A hiperfluorescência pode se originar pelo acúmulo de fluoresceína nos espaços entre o EPR e a membrana de Bruch, devido ao descolamento focal do EPR (BRANCATO; TRABUCCHI, 1998).

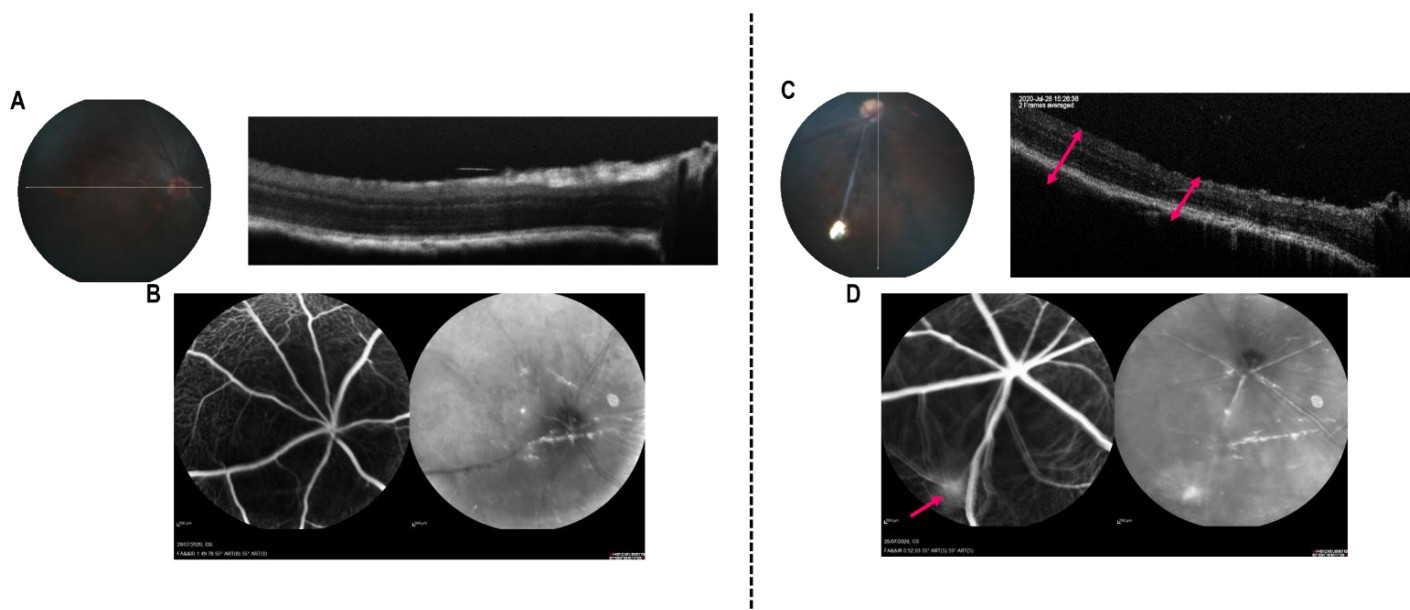
No período de 14 dias foi realizada apenas a imagem de angiografia, uma vez que o único objetivo era verificar as condições da vasculatura do fundo dos olhos. Pelas imagens (**Figura 44**) pode-se perceber uma redução considerável dos pontos de hiperfluorescência.

**Figura 44 - Imagens representativas das angiografias dos olhos de ratos Long Evans, 14 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.**



Com 28 dias, praticamente não foram verificadas alterações vasculares (**Figura 45**); no entanto, a OCT revela camadas celulares pouco definidas e redução da espessura da retina em alguns pontos (**Figura 45-C**).

**Figura 45 - Imagens representativas de (A) e (C) OCT e (B) e (D) angiografia dos olhos de ratos Long Evans, 28 dias após as injeções intravítreas de leuc-a.**



De modo geral, as manifestações da toxicidade da leuc-a apresentaram caráter mais agudo, por volta de sete dias após as injeções intraoculares, e foram arrefecendo com o passar dos dias.

### 8.6.2 Imuno-histoquímica em montagens planas da retina

A imuno-histoquímica por fluorescência é uma técnica que explora a ligação específica entre um antígeno e um anticorpo para detectar e localizar antígenos específicos em células e tecidos, sendo detectadas e examinadas por microscópios de fluorescência. Em geral, os anticorpos monoclonais são os de escolha, uma vez que eles visam um único epítopo e tendem a ser mais específicos; em contrapartida, os anticorpos policlonais, que se ligam a diferentes epítopos, são mais sensitivos. No método indireto de análise, utilizado no nosso experimento, o anticorpo primário se liga ao epítopo do antígeno-alvo e, em seguida, o anticorpo secundário, que é marcado e fluorescente, se liga ao primário, permitindo a amplificação do sinal (MAGAKI et al., 2019).

O IBA-1 (do inglês *ionized calcium-binding adapter molecule 1*) é o marcador microglial (macrófagos) mais usado na imuno-histoquímica, ou seja, ele marca as células de defesa do sistema nervoso central e, conseqüentemente, da retina. Células positivas para IBA-1 também são encontradas após eventos isquêmicos: os achados histopatológicos em um infarto cerebral isquêmico subagudo, fase II, incluem a infiltração de macrófagos (LIER; STREIT; BECHMANN, 2021; SCHWABENLAND et al., 2021).

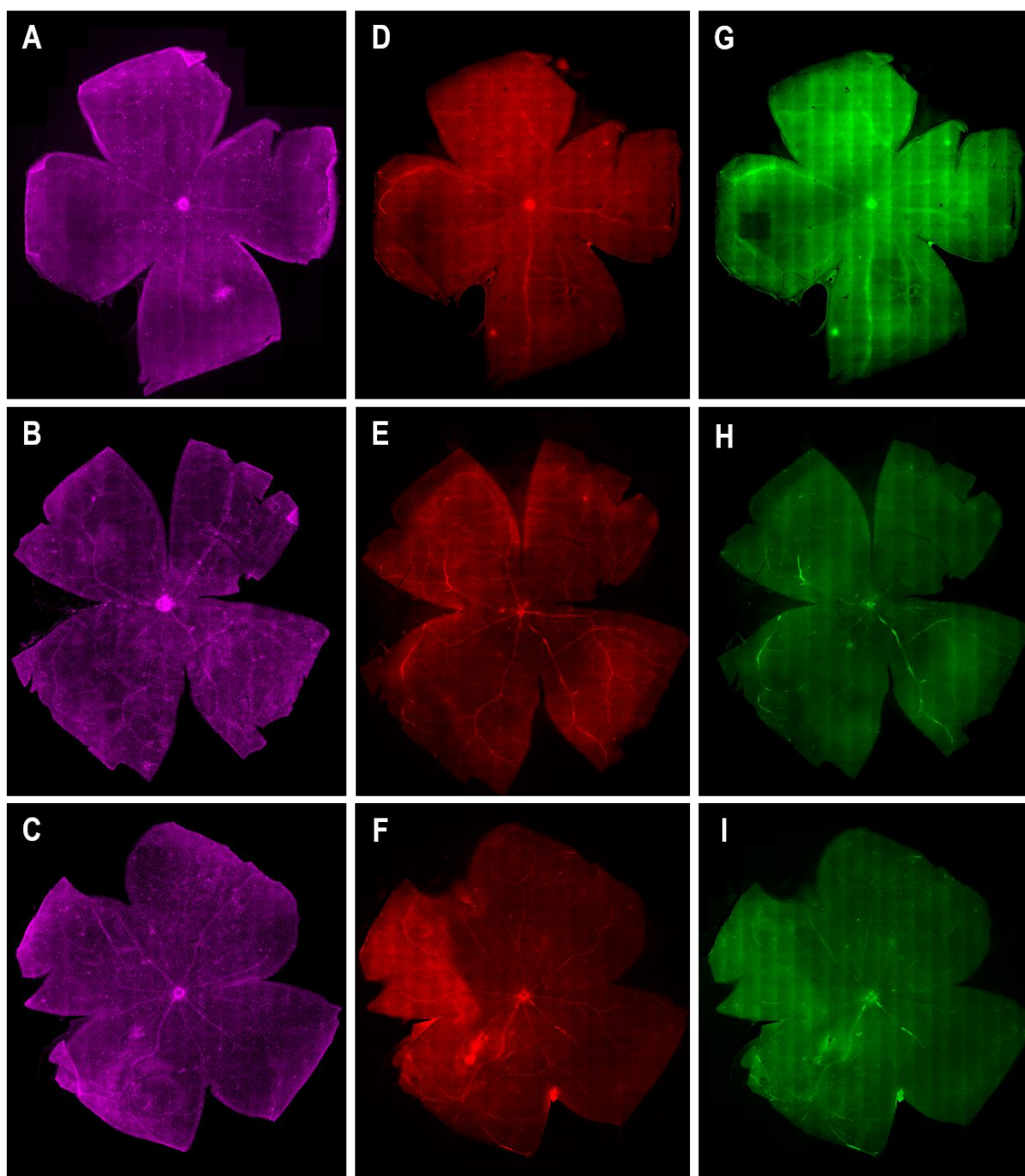
O NG-2 é um antígeno proteoglicano nervo-glial que atua como uma proteína transmembrana do tipo I, envolvida na proliferação e migração celular. Essa proteína é expressa, principalmente, em pericitos, que são células do sistema nervoso central que envolvem o endotélio dos vasos sanguíneos e atuam na regulação do calibre vascular e do fluxo da microcirculação retiniana, além da reparação dos vasos sanguíneos (BOEWE et al., 2022).

O CD-31 (também conhecido como PECAM-1, do inglês *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) é um receptor de membrana glicosilado, expresso por

leucócitos, plaquetas e células endoteliais. Por ser a glicoproteína mais abundante no endotélio vascular, o CD-31 é um antígeno comumente utilizado para identificar vasos sanguíneos. Em condições fisiológicas, o CD-31 é expresso constitutivamente e exclusivamente nas células que interagem na interface do vaso sanguíneo, sendo necessário para manter a homeostase na circulação (CALIGIURI, 2020). Além disso, o CD-31 atua diretamente na permeabilidade vascular e pode ter papel importante em processos como trombose, inflamação e resposta imune (LERTKIATMONGKOL et al., 2016).

Esses três antígenos foram escolhidos para avaliar, principalmente, os efeitos diretos da leuc-a nos vasos sanguíneos da retina e a ativação microglial como sinal de inflamação. A imuno-histoquímica é uma técnica que tem caráter qualitativo e semiquantitativo; no caso deste estudo, são apresentadas imagens da retina plana representativas do grupo controle e do grupo desafiado com a leuc-a, a título de comparação qualitativa, como disposto na **Figura 46**.

Figura 46 - Imagens representativas do ensaio de imuno-histoquímica em montagens planas da retina. As imagens (A), (D) e (G) correspondem ao grupo controle; as imagens (B), (E), (H), (C), (F) e (I) correspondem a animais do grupo tratado com a leuc-a. A cor roxa representa a marcação com o anticorpo para IBA-1; a cor vermelha representa a marcação com o anticorpo para NG-2; e a cor verde representa a marcação com o anticorpo para CD-31.



As figuras em roxo (**Figuras 46-A-C**) representam a marcação da micróglia pelo IBA-1. Considerando um contexto de inflamação provocado pela leuc-a, baseado nos resultados anteriores, é de se esperar que as retinas dos animais tratados apresentem fluorescência mais intensa em relação ao controle, uma vez que a ativação das células de defesa (micróglia) se dá em virtude da inflamação do tecido. A **Figura 46-A**, referente ao controle, tem fluorescência mais intensa em relação a um dos animais tratados (**Figura 46-B**), mas menos intensa em relação ao outro animal tratado (**Figura 46-C**). Apesar de inconclusivo, esse resultado aponta para uma possível ativação microglial frente à exposição pela leuc-a.

As figuras em vermelho (**Figuras 46-D-F**) representam a marcação dos pericitos do endotélio pelo NG-2. Em um tecido saudável, os pericitos, que atuam na estabilidade vascular, estão presentes em maior concentração do que em estados patológicos. Isso justifica a maior intensidade de fluorescência no animal controle (**Figura 46-D**) em comparação aos animais tratados (**Figuras 46-E e F**). O mesmo se aplica ao CD-31 (**Figuras 46-G-I**), que está relacionado com a integridade do endotélio vascular; em um contexto de toxicidade, a concentração e, logo, a intensidade da fluorescência, são menores (**Figuras 46-H e I**) em relação ao tecido saudável de um animal controle (**Figura 46-G**).

Segundo Gutierrez e colaboradores (2016), estudos imunohistoquímicos revelaram que as MPVSs P-II e P-III se ligam preferencialmente à microvasculatura quando aplicadas em tecido murino e apresentam um padrão de localização no colágeno IV e nas paredes vasculares. Em contrapartida, as MPVSs, como a leuc-a, apresentam uma localização mais espalhada pela matriz extracelular, e não concentrada nos vasos.

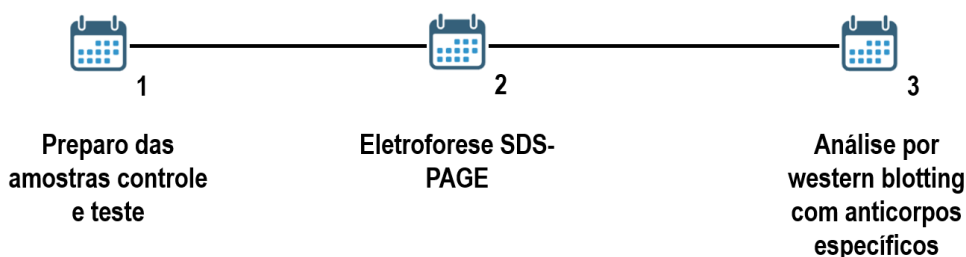
Esses resultados corroboram os dados anteriores, apontando para um efeito vascular tóxico da leuc-a na retina dos olhos de ratos.

## **9 ETAPA EXPERIMENTAL 6: AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DA MATRIGEL PELA LEUC-A E ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING**

---

As etapas envolvidas no desenvolvimento dessa seção estão demonstradas na **Figura 47**.

**Figura 47 – Protocolo experimental da avaliação hidrólise da matrigel pela leuc-a e análise por western blotting.**



## 9.1 Materiais

- Matrigel (Corning, USA).
- Água ultrapura (Mili-Q® plus, Merck Millipore, EUA).
- Membrana de nitrocelulose (Hybond ECL®, GE Healthcare, USA)
- Aparato para eletroforese vertical (Trans-Blot®, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
- Chemiluminescence imaging system - ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
- Anticorpo primário para laminina (NB300-144, Novus).
- Anticorpo primário para nidogênio (AF2570, RD Systems).
- Anticorpo secundário para proteína G conjugada com peroxidase (P21041, Thermo Scientific).
- Azul de comassie R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## 9.2 Avaliação da hidrólise dos componentes da Matrigel pela leuc-a

A Matrigel é uma matriz da membrana basal obtida de células de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm (356234), fornecida pela Corning (Bedford, USA). Para a avaliação da degradação da Matrigel pela leuc-a, foram preparadas duas amostras: a

amostra controle, contendo 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de Matrigel (correspondente a 50  $\mu\text{g}$ ) e 10  $\mu\text{L}$  de água milli-Q, e a amostra teste, contendo uma proporção de 50  $\mu\text{g}$  de matrigel para 1  $\mu\text{g}$  de leuc-a, em água milli-Q. Após o preparo, as amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C e, após esse período, a reação foi parada com a adição do tampão de amostra com redução. Em seguida, as amostras foram colocadas na água fervente por cinco minutos, ficando prontas para a eletroforese.

As amostras controle e teste foram corridas em um gel de poliacrilamida do tipo SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), em gradiente de 5 % a 15 %, usando um aparato para eletroforese vertical (Trans-Blot®, Bio-Rad, USA). 30  $\mu\text{L}$  das amostras, mais 2  $\mu\text{L}$  do padrão foram aplicados nas canaletas do gel seguindo a seguinte ordem, da esquerda para a direita: padrão > controle > leuc-a. Uma vez finalizada a corrida, o gel foi deixado no tampão de fixação por 30 min, sob agitação e, em seguida, foi adicionado o corante azul de *coomassie* por mais 10 min, para coloração das bandas. Os géis foram revelados no aparelho Chemidoc, e as imagens posteriormente tratadas usando o software Image lab.

### 9.3 Western blotting

Para a realização do western blotting, as amostras controle e teste foram preparadas e corridas no SDS-PAGE, conforme descrito no item 10.1.2.1. Em seguida, as proteínas e seus fragmentos de clivagem foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose, usando o aparato para eletroforese vertical. Após esse processo, as membranas foram bloqueadas com PBS Tween® 0,05 % e leite em pó desnatado 5 %, por 1 h sob agitação, e, logo após, incubadas com os anticorpos primários para laminina (1:5000), colágeno IV (1:4000) e nidogênio (1:5000), diluídos em PBS Tween® 0,05 % e leite em pó desnatado 1 %, por 1 h sob agitação. Após as três lavagens das membranas com PBS Tween® 0,05 % foram adicionados os anticorpos secundários para proteína G (1:5000), também diluídos em PBS Tween® 0,05 % e leite em pó desnatado 1 %, por 1 h sob agitação. As membranas foram, então, novamente lavadas e reveladas no aparelho Chemidoc.

## 9.4 Resultados e discussão

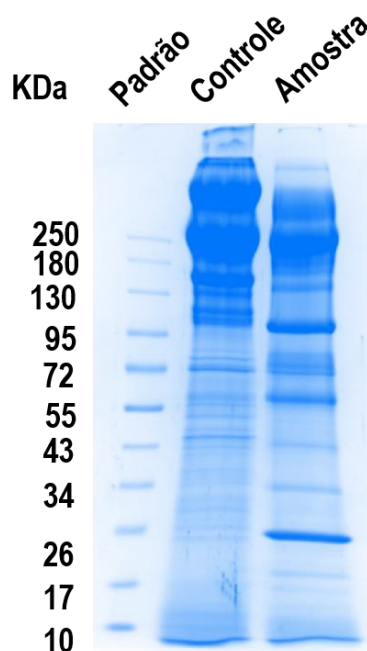
### 9.4.1 Avaliação da hidrólise dos componentes da matrigel pela leuc-a

As membranas basais são matrizes extracelulares aceluladas que se encontram, principalmente, abaixo das células epiteliais e endoteliais. Essas membranas são compostas por lamininas, colágeno IV, proteoglicanos, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e proteases (BENTON et al., 2014).

Matrigel é um derivado biológico do hidrogel à base de matriz extracelular, purificado do sarcoma murino *Engelbreth-Holm-Swarms (EHS)*, composto pelas mesmas proteínas presentes nas membranas basais, que vem sendo utilizado como suporte para crescimento de células 3D (JOSAN; KAKAR; RAHA, 2021; KAUR et al., 2021).

A **Figura 48** representa a membrana de eletroforese revelada, contendo as bandas das proteínas e seus produtos de hidrólise.

**Figura 48 – Avaliação da degradação dos componentes da Matrigel pela leuc-a, por análise eletroforética.**



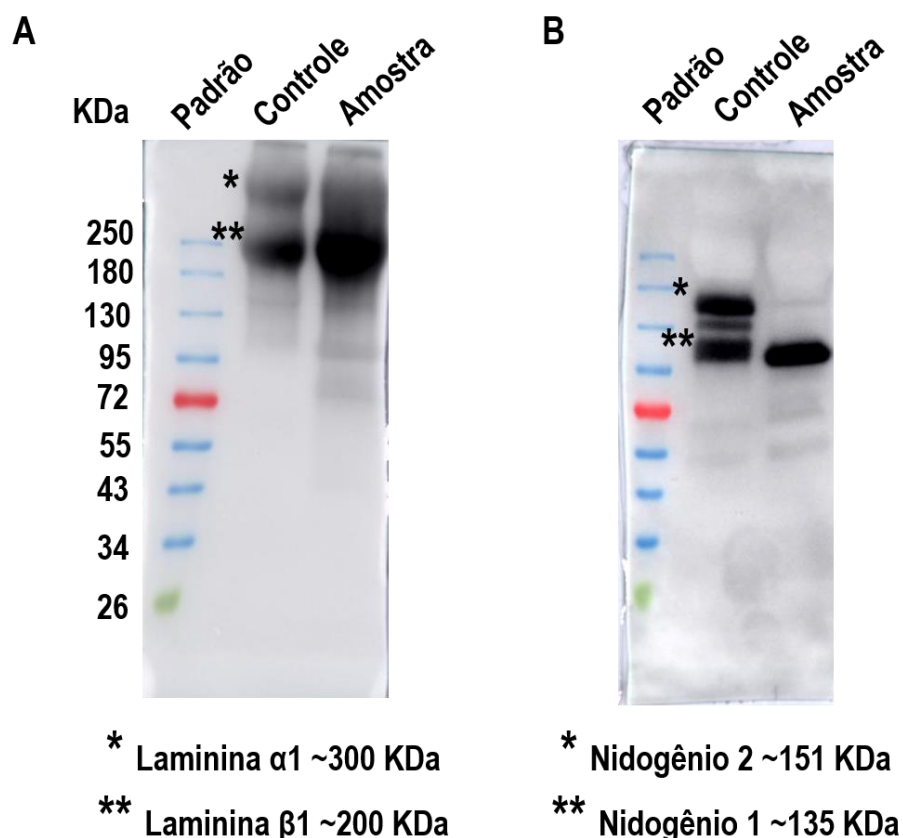
As bandas referentes ao controle correspondem às proteínas presentes na matrigel, que foram separadas de acordo com suas respectivas massas moleculares. Já na coluna da amostra é possível verificar a redução da intensidade de algumas bandas, como por exemplo a de ~100 KDa, o surgimento de outras (~41, 34 e 20 KDa), correspondentes a produtos de degradação, bem como a banda referente à leuc-a (~23 KDa). Esse resultado indica que houve degradação da Matrigel pela leuc-a, contudo, apenas pela eletroforese não é possível identificar exatamente quais proteínas foram degradadas e seus respectivos fragmentos proteolíticos.

#### 9.4.2 *Western blotting*

Western blotting é uma técnica simples e eficaz usada para investigar, entre outras coisas, interações entre proteínas. De maneira geral, as proteínas presentes da amostra em estudo são separadas ao passarem por um gel e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, na qual são adicionados anticorpos primários e secundários que se ligarão à proteína-alvo e permitirão a visualização e quantificação dessa proteína. Trata-se, portanto, de uma técnica que fornece tanto resultados qualitativos, em que a presença da proteína-alvo é confirmada por identificação visual da banda, quanto quantitativos, em que a banda pode ser medida para quantificar a expressão da proteína (PILLAI-KASTOORI; SCHUTZ-GESCHWENDER; HARFORD, 2020).

Assim, realizamos as análises de western blotting com anticorpos específicos para as proteínas de interesse, como apresentado na **Figura 49**.

Figura 49 – Avaliação da hidrólise dos componentes da Matrigel, sendo (A) laminina, (B) nidogênio, pela leuc-a, por análise de western blotting.



A leuc-a hidrolisou uma banda de aproximadamente 300 kDa, que provavelmente corresponde à laminina  $\alpha$ 1, mas não surtiu efeito na laminina  $\beta$ 1, de aproximadamente 200 KDa. Além disso, enquanto o nidogênio 1 permaneceu intacto, o nidogênio 2 foi hidrolisado, dando origem a uma banda de fragmento proteolítico de aproximadamente 150 KDa.

Outros estudos já descreveram que muitas MPVSs com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica também são capazes de hidrolisar os componentes da membrana basal *in vitro*. A diferença entre proteases hemorrágicas e não hemorrágicas pode estar relacionada ao grau de hidrólise de componentes específicos da membrana basal, de modo que já foi observado que o colágeno IV sofre uma degradação mais acentuada por proteases hemorrágicas em relação às não hemorrágicas, enquanto a degradação da laminina e do nidogênio é mais similar (GUTIÉRREZ et al., 2016). Essa questão também foi demonstrada em um outro estudo que comparou a degradação da Matrigel

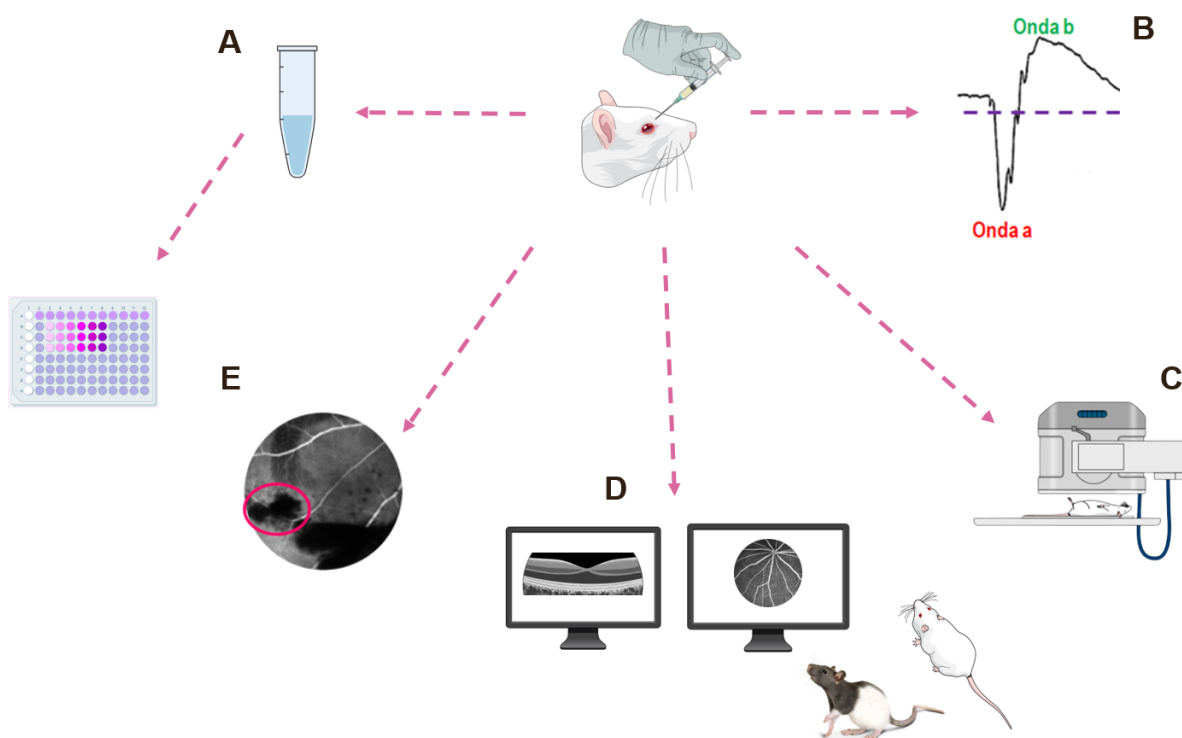
*in vitro*, indicando que a leuc-a provocou degradação mais lenta e menos intensa do colágeno IV e do percalano, nas mesmas condições de análise da BaP1, uma protease hemorrágica (ESCALANTE et al., 2011).

## 10 DISCUSSÃO GERAL

A leuc-a é uma MPVS da classe P-I que vem sendo bastante estudada pelo grupo de pesquisa do Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais da FUNED. O grande interesse nessa protease está associado ao seu potencial fibrinolítico, sem provocar eventos hemorrágicos, como já demonstrado na literatura. A partir dos resultados descritos nos estudos conduzidos por Bello e colaboradores (2006) e Agero e colaboradores (2007), sobre a similaridade entre a mutalisina II, uma MPVS P-I não hemorrágica e com atividade trombolítica (AGERO et al., 2007; BELLO et al., 2006), e a leuc-a, surgiu a ideia de avaliar uma possível atividade trombolítica da leuc-a no tratamento das oclusões de veia da retina.

Assim, a proposta inicial do projeto seria testar e definir as doses seguras da leuc-a para uso intravítreo em olhos de ratos saudáveis; em seguida, trabalharíamos no desenvolvimento de um modelo de oclusão de veia da retina, no qual testaríamos a eficácia das doses selecionadas. Na **Figura 50** está representado um resumo de todas as etapas experimentais que foram desenvolvidas ao longo deste trabalho.

**Figura 50 – Esquema geral contendo todas as etapas experimentais.**



Na primeira fase do estudo, verificamos que a viabilidade celular foi significativamente reduzida em todas as doses testadas de leuc-a em células ARPE-19 pelo método da sulfarrodamina B (**Figura 50 – A**). Apesar do resultado aparentemente negativo, muitas vezes os estudos em células têm efeitos mais exacerbados, uma vez que o contato direto da substância a ser testada com a célula, sem nenhum outro interferente, pode potencializar o efeito, seja de atividade ou toxicidade.

Iniciamos, então, os estudos *in vivo* para avaliar a segurança do uso da leuc-a nos olhos de ratos saudáveis nas quatro doses propostas. Em um primeiro momento, buscamos investigar a segurança da leuc-a por meio do exame de eletrorretinografia, e concluímos que apenas a dose mais alta foi suficiente para comprometer a resposta celular da retina frente aos estímulos luminosos, o que nos deu indícios de que as outras três doses poderiam ser seguras (**Figura 50 – B**).

Os exames de imagem de OCT e angiografia foram realizados em uma outra etapa com o objetivo de mapear o fundo dos olhos dos animais e investigar possíveis alterações teciduais que não são vistas no exame de ERG. De fato, diversos sinais de toxicidade se manifestaram após a administração intravítrea da leuc-a; eventos vasculares, como vasodilatação e oclusão de vasos, descolamento hialoide do vítreo, descolamento seroso da retina, perda da integridade das camadas retinianas e presença de infiltrado inflamatório foram algumas das principais alterações vistas. Ao contrário do observado nos resultados anteriores, esses eventos ocorreram com todas as doses testadas e de forma não homogênea, isto é, todos os grupos de tratamento apresentaram alguns animais com essas alterações e outros com aspecto completamente saudável e fisiológico. Considerando que o exame de ERG não foi realizado em conjunto com o OCT e angiografia, não podemos concluir que os eventos de toxicidade observados nesses últimos exames poderiam comprometer a funcionalidade elétrica das células retinianas.

No entanto, o que mais chamou a atenção foram os eventos relacionados a processos hemorrágicos, como petéquias e focos maiores e menores de hemorragia em diferentes regiões do fundo do olho (**Figura 50 – D**). Essas alterações, em específico, não eram esperadas, uma vez que a leuc-a é uma proteína não hemorrágica, como já foi elucidado. Sabemos que a leuc-a apresenta diferentes isoformas e que o processo de purificação do veneno bruto pode não ser capaz de separá-las completamente. Por isso, a cada nova extração e purificação, o potencial hemorrágico da leuc-a é testado

a partir de exposições subcutâneas em camundongos, conforme descrito anteriormente. Sugerimos, então, que talvez houvesse uma diferença na atividade hemorrágica da leuc-a entre as espécies animais, já que os testes são realizados em camundongos e, no nosso caso, usamos ratos como modelo animal. Contudo, ao realizarmos o teste em um rato Wistar, o resultado foi o mesmo: a leuc-a não induziu hemorragia.

Uma das propostas que poderiam justificar esse efeito é a diferença de composição tecidual entre o olho e a pele, na qual os testes de hemorragia são realizados. Como já discutido, as MPVS não hemorrágicas e hemorrágicas hidrolisam praticamente os mesmos constituintes da membrana basal, apenas com intensidades diferentes, e o colágeno IV mostrou ser o grande diferencial nesse quesito. Escalante *et al* 2011, por exemplo, demonstraram que a leuc-a hidrolisa o colágeno IV (**Figura 50 – E**), que é um dos tipos de colágeno mais abundantes nas membranas basais nos olhos (PONSIOEN *et al.*, 2008; REGOLI *et al.*, 2020). Além disso, a pele, tanto de camundongos e ratos quanto de humanos, tem em sua composição os colágenos tipos I e III, majoritariamente (SUNAGA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Esse fator poderia justificar o fato da leuc-a não induzir hemorragia nos testes subcutâneos e apresentar o efeito oposto quando injetada nos olhos. Esses resultados se reproduziram quando a leuc-a foi avaliada em ratos não pigmentados, o que confere robustez às análises realizadas.

A investigação da depuração do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -leuc-a revelou que a protease permanece intacta na cavidade vítrea por até 6 h (**Figura 50 – C**). A atividade radioativa utilizada no estudo não nos permitiu ultrapassar 6 h de análise, visto que, devido ao decaimento do tecnécio-99m no período, a relação sinal/ruído foi sendo afetada e comprometeu a qualidade e interpretação das imagens em tempos mais longos. Ainda assim, é possível dizer que esse tempo de residência no olho poderia ser interpretado como positivo, caso a leuc-a tivesse apresentado efeitos terapêuticos, ou como negativo, considerando que a intensidade dos efeitos tóxicos aumenta quanto maior for o período de exposição. De qualquer forma, esse experimento serve como base para futuras investigações do perfil farmacocinético da leuc-a em outros órgãos e tecidos.

## 11 CONCLUSÃO

A leuc-a não se mostrou segura para o uso intraocular com base nas concentrações testadas e nas condições experimentais deste estudo. Assim, não prosseguimos com a investigação da atividade da leuc-a em um modelo de oclusão de veias da retina. No entanto, os dados encontrados podem direcionar estudos posteriores acerca dos aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos com suas atividades trombolítica e hemorrágica.

## 12 PERSPECTIVAS

Os avanços da ciência têm demonstrado cada vez mais a relevância de estudos acerca dos produtos naturais presentes na nossa biodiversidade, como os venenos de serpentes. Mas, apesar do indiscutível potencial terapêutico dessas substâncias, estudos mais abrangentes e completos são necessários, dada a complexidade bioquímica dos produtos naturais. Isso fica claro com os resultados apresentados nesta tese, que divergem de algumas características da leuc-a até então descritas na literatura.

De fato, o olho é um órgão bastante complexo e sensível, de modo que muitos fármacos e substâncias que são seguros para outros fins mostram-se tóxicos no ambiente ocular. Portanto, ainda que os resultados não tenham sido favoráveis ao uso da leuc-a para o tratamento das oclusões de veias da retina (e possivelmente outras doenças oculares também) nas condições experimentais desta tese, existe a possibilidade de que essa protease seja segura para uso em outros tecidos-alvo e em outras concentrações.

Os resultados aqui discutidos sugerem que a classificação da leuc-a como não hemorrágica é relativa, e isso abre o campo de pesquisa para investigar os fatores bioquímicos responsáveis por essa diferença de comportamento. O detalhamento não só da atividade terapêutica, como também dos efeitos que levam à toxicidade (como por exemplo os efeitos vasculares apresentados), enriquecem a compreensão acerca de todo o potencial da leuc-a para usos futuros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERO, U. et al. Effect of mutalysin II on vascular recanalization after thrombosis induction in the ear of the hairless mice model. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 698–706, 2007.

AGRAHARI, V. et al. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. **Drug Delivery and Translational Research** Springer Verlag, 1 dez. 2016.

ANTUNES, A. et al. Eficácia de hipotensores oculares tópicos após capsulotomia posterior. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 5, p. 706–710, 2008.

ARRIBADA, R. G. et al. The Use of Polymer Blends in the Treatment of Ocular Diseases. **Pharmaceutics** MDPI, 1 jul. 2022.

AWWAD, S. et al. Principles of pharmacology in the eye. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 23, p. 4205–4223, 2017a.

AWWAD, S. et al. Principles of pharmacology in the eye. **British Journal of Pharmacology** John Wiley and Sons Inc., 1 dez. 2017b.

BEHAR-COHEN, F. et al. Anatomie de la rétine. **Medecine/Sciences**, v. 36, n. 10, p. 886–892, 1 out. 2020.

BELLO, C. A. et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from Bothrops leucurus (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 189–200, 2006.

BENCHORIN, G. et al. Assessment of Murine Retinal Function by Electroretinography. **Bio Ptotoc**, v. 7, n. 7, 2017.

BENTON, G. et al. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. **Advanced Drug Delivery Reviews** Elsevier B.V, 15 dez. 2014.

BERNARDES-OLIVEIRA, E. et al. Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Promote Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis via the Mitochondrial Depolarization of Cervical Cancer Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

BERTHOLIM, L. et al. Systemic effects of hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Untargeted peptidomics to explore the pathodegradome of plasma proteins. **Toxins**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2021.

BOEWE, A. S. et al. Inhibition of CK2 Reduces NG2 Expression in Juvenile Angiofibroma. **Biomedicines**, v. 10, n. 5, 1 maio 2022.

BOYES, W. K. et al. NeuroToxicology Full length article Toluene inhalation exposure for 13 weeks causes persistent changes in electroretinograms of Long – Evans rats. **Neurotoxicology**, v. 53, p. 257–270, 2016.

BRANCATO, R.; TRABUCCHI, G. Fluorescein and indocyanine green angiography in vascular chorioretinal diseases. **Seminars in Ophthalmology** W.B. Saunders, 1998.

CAI, Z. et al. **Triple Multi-scale Adversarial Learning with Self-attention and Quality Loss for Unpaired Fundus Fluorescein Angiography Synthesis**. [s.l: s.n.].

CALIGIURI, G. CD31 as a therapeutic target in atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 126, n. 9, p. 1178–1189, 24 abr. 2020.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics: Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**...nov. 2007.

CASTILLA-GUERRA, L.; GÓMEZ ESCOBAR, A.; GÓMEZ CERREZO, J. F. Utility of Doppler ultrasound for the study of ocular vascular disease. **Revista Clinica Espanola** Elsevier Doyma, 1 ago. 2021.

CEHOFSKI, L. J.; HONOR, B.; VORUM, H. A Review: Proteomics in Retinal Artery Occlusion, Retinal Vein Occlusion, Diabetic Retinopathy and Acquired Macular Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 907, p. 1–24, 2017.

CHRONOPOULOS, A. et al. The significance of pigment epithelial detachment in central serous chorioretinopathy. **European Journal of Ophthalmology**, v. 31, n. 2, p. 556–565, 1 mar. 2021.

DAMICO, F. M. et al. Vitreous pharmacokinetics and electroretinographic findings after intravitreal injection of acyclovir in rabbits. **Clinics**, v. 67, n. 8, p. 931–937, 2012.

DE BARROS, A. L. B. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled bombesin analog for breast cancer identification. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 295, n. 3, p. 2083–2090, 2013.

DE MORAIS, I. C. et al. Bothrops leucurus venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38–46, 2013a.

DE MORAIS, I. C. O. et al. Bothrops leucurus venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 38–46, 2013b.

DE SOUZA, R. A. et al. Unraveling the distinctive features of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using molecular simulations. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 30, n. 1, p. 69–83, 2016a.

DE SOUZA, R. A. et al. Unraveling the distinctive features of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using molecular simulations. **J Comput Aided Mol Des**, v. 30, p. 69–83, 2016b.

DEL AMO, E. M. et al. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. **Progress in Retinal and Eye Research** Elsevier Ltd, 1 mar. 2017.

EDINGTON, M.; CONNOLLY, J.; CHONG, N. V. Pharmacokinetics of intravitreal anti-VEGF drugs in vitrectomized versus non-vitrectomized eyes. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 0, n. 0, 2017.

ESCALANTE, T. et al. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

EUGENIA, I. R. et al. The role of Optical Coherence Tomography in optic neuropathies. **Romanian Journal of Ophthalmology**, v. 62, n. 1, p. 3–14, 19 abr. 2018.

FERNANDES, R. S. et al. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. **Nuclear Medicine Communications**, p. 1, 2015.

FERREIRA, R. N. et al. Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from

Bothrops leucurus snake venom. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, n. 8, p. 798–801, 2009a.

FERREIRA, R. N. et al. Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom. **Structural Biology and Crystallization Communications**, n. May, p. 798–801, 2009b.

FIALHO, S. L. et al. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891–896, 2003.

FIALHO, S. L.; CUNHA, A. DA S. Drug delivery systems for the posterior segment of the eye: Fundamental basis and applications. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 173–179, 2007.

FISCHER, T.; RIEDL, R. Challenges with matrix metalloproteinase inhibition and future drug discovery avenues. **Expert Opinion on Drug Discovery** Taylor and Francis Ltd., 2021.

FISHMAN, G. A. et al. Electrophysiologic Testing in Disorders of the Retina, Optic Nerve and Visual Pathway. Em: **Lifelong Education for the Ophthalmologist (LEO)**. [s.l: s.n.]. p. 1–312.

FORRESTER, J. V et al. **The Eye Basic Sciences in Practice**. [s.l: s.n.]. v. 4

FOSTER, D. M. Noncompartmental Versus Compartmental Approaches To Pharmacokinetic Analysis. **Principles of Clinical Pharmacology**, p. 102–130, 2007.

FREITAS-DE-SOUSA, L. A. et al. Insights into the mechanisms involved in strong hemorrhage and dermonecrosis induced by atroxlysin-Ia, a PI-class snake venom metalloproteinase. **Toxins**, v. 9, n. 8, 2017.

FULTON, A. B. et al. The neurovascular retina in retinopathy of prematurity. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 28, n. 6, p. 452–482, 2009.

GABALLA, S. A. et al. Corticosteroids in ophthalmology: drug delivery innovations, pharmacology, clinical applications, and future perspectives. **Drug Delivery and Translational Research** Springer, 1 jun. 2021.

GARCÍA-QUINTANILLA, L. et al. Pharmacokinetics of Intravitreal Anti-VEGF Drugs in Age-Related Macular Degeneration. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 365, p. 1–22, 2019.

GAUDANA, R. et al. Ocular drug delivery. **The AAPS journal**, v. 12, n. 3, p. 348–360, 2010a.

GAUDANA, R. et al. Ocular drug delivery. **The AAPS journal**, set. 2010b.

GIBLIN, J. P. et al. Ion Channels in the Eye: Involvement in Ocular Pathologies. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. Academic Press Inc., 2016.

GOMES, M. S. R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from Bothrops leucurus snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, n. 3, p. 290–300, 2011.

GOODMAN & GILMAN. **THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS THIRTEENTH EDITION**. [s.l: s.n.]. v. 13

GOTE, V. et al. Ocular drug delivery: Present innovations and future challenges. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, 2019.

GREMSKI, L. H. et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom. **Toxicology in Vitro**, v. 50, p. 120–134, 2007a.

GREMSKI, L. H. et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 120–134, 2007b.

GUPTA, A.; SUN, J. K.; SILVA, P. S. Complications of Intravitreal Injections in Patients with Diabetes. **Seminars in Ophthalmology**, v. 33, n. 1, p. 42–50, 2 jan. 2018.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, 26 mar. 2016.

HANSEN, R. M. et al. The Neural Retina in Retinopathy of Prematurity. **Progress in Retinal and Eye Research**, 2016.

HAYREH, S. S. Prevalent misconceptions about acute retinal vascular occlusive disorders. **Progress in Retinal and Eye Research** Elsevier Ltd, 2005.

HAYREH, S. S. Ocular vascular occlusive disorders: Natural history of visual outcome. **Progress in Retinal and Eye Research** Elsevier Ltd, 2014.

HAYREH, S. S. Photocoagulation for retinal vein occlusion. **Progress in Retinal and Eye Research** Elsevier Ltd, 1 nov. 2021.

HERMOGENES, A. L. et al. Interaction of a plasminogen activator proteinase, LV-PA with human  $\alpha$ 2-macroglobulin. **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 490–494, 2006.

HIGUCHI, D. A. et al. Toxicon Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 123–129, 2011.

HUANG, D.; CHEN, Y.; RUPENTHAL, I. D. Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017.

HUANG, D.; CHEN, Y. S.; RUPENTHAL, I. D. Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 126, p. 96–112, 2018.

HUANG, W. et al. Application of electroretinography (ERG) in early drug development for assessing retinal toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2015.

HURLEY, J. B. **Retina Metabolism and Metabolism in the Pigmented Epithelium: A Busy Intersection**. **Annual Review of Vision Science** Annual Reviews Inc., 15 set. 2021.

IP, M.; HENDRICK, A. Retinal Vein Occlusion Review. **Journal of Ophthalmology**, v. 7, n. 1, p. 40–45, 2018a.

IP, M.; HENDRICK, A. Retinal vein occlusion review. **Asia-Pacific Journal of Ophthalmology**, v. 7, n. 1, p. 40–45, 2018b.

JAGER, R. D. et al. RISKS OF INTRAVITREOUS INJECTION: A COMPREHENSIVE REVIEW. **The Journal of Retinal and Vitreous Diseases**, v. 24, n. 5, p. 676–698, 2004.

JIANG, Z. et al. A super-resolution method-based pipeline for fundus fluorescein angiography imaging 08 Information and Computing Sciences 0801 Artificial Intelligence and Image Processing Robert Koprowski. **BioMedical Engineering Online**, v. 17, n. 1, 19 set. 2018.

JONAS, J. B.; GLACET-BERNARD, A.; COSCAS, G. Retinal Vein Occlusions. **Dev Ophthalmol**, v. 58, p. 139–167, 2017.

JOSAN, C.; KAKAR, S.; RAHA, S. Matrigel® enhances 3T3-L1 cell differentiation. **Adipocyte**, v. 10, n. 1, p. 361–377, 2021.

JOSEPH, R. R. Drug delivery to the eye: what benefits do nanocarriers offer? **Nanomedicine**. [s.l: s.n.].

KANDHWAL, M. et al. **Role of matrix metalloproteinase in wound healing**Am J Transl Res. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ajtr.org>.

KAPLAN, H. J. Anatomy and Function of the Eye. **Chem Immunol Allergy. Basel, Karger**, v. 92, p. 4–10, 2007.

KARAMANOS, N. K. et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **FEBS Journal**, v. 288, n. 24, p. 6850–6912, 1 dez. 2021.

KAUR, I. P.; KAKKAR, S. Nanotherapy for posterior eye diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 100–112, 10 nov. 2014.

KAUR, S. et al. Non-matrigel scaffolds for organoid cultures. **Cancer Letters** Elsevier Ireland Ltd, 28 abr. 2021.

KIDA, T. Mystery of Retinal Vein Occlusion: Vasoactivity of the Vein and Possible Involvement of Endothelin-1. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

KIM, H. M. et al. A Prediction Model for the Intraocular Pharmacokinetics of Intravitreally Injected Drugs Based on Molecular Physicochemical Properties. **Ophthalmic Research**, p. 1–9, 2019.

KIM, H. M.; WOO, S. J. Ocular drug delivery to the retina: Current innovations and future perspectives. **Pharmaceutics** MDPI AG, 1 jan. 2021.

KIM, Y. C. et al. Ocular delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release Elsevier**, 28 set. 2014.

KOH, A. E. et al. Retinal degeneration rat model: A study on the structural and functional changes in the retina following injection of sodium iodate. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 196, n. February, p. 111514, 2019.

KOHLHOFF, M. et al. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2181–2195, 2012.

KOLB, H. et al. Cellular organization of the vertebrate retina. **Progress in Brain Research**, v. 131, 2001.

KOMPELLA, U. B. et al. Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging. **Progress in Retinal and Eye Research**, set. 2013.

LALU, L. et al. Novel nanosystems for the treatment of ocular inflammation: Current paradigms and future research directions. **Journal of Controlled Release**, 2017.

LERTKIATMONGKOL, P. et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). **Current Opinion in Hematology** Lippincott Williams and Wilkins, 2016.

LEVASHOVA, Z. et al. Direct Site-Specific Labeling of the Cys-Tag Moiety in scVEGF with Technetium 99m. **Bioconjugate Chem.**, v. 19, n. 5, p. 1049–1054, 2008.

LI, B.; BARNES, G. E.; HOLT, W. F. The decline of the photopic negative response (PhNR) in the rat after optic nerve transection. **Documenta Ophthalmologica**, n. 2005, p. 23–31, 2006.

LI, H. et al. Matrix Metalloproteinase-9 as an Important Contributor to the Pathophysiology of Depression. **Frontiers in Neurology** Frontiers Media S.A., 18 mar. 2022.

LIER, J.; STREIT, W. J.; BECHMANN, I. Beyond activation: Characterizing microglial functional phenotypes. **Cells MDPI**, 1 set. 2021.

LIU, K. et al. The Retinal Vasculature and Function of the Neural Retina in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 6, p. 2639–2647, 2006.

MACDONALD, D. The ABCs of RVO: A review of retinal venous occlusion. **Clinical and Experimental Optometry** Blackwell Publishing Ltd, 1 jul. 2014a.

MACDONALD, D. The ABCs of RVO: A review of retinal venous occlusion. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 97, n. 4, p. 311–323, 1 jul. 2014b.

MAFEE, M. F. et al. Anatomy and pathology of the eye: Role of MR imaging and CT. **Neuroimaging Clinics of North America** W.B. Saunders, 2005.

MAGAKI, S. et al. An introduction to the performance of immunohistochemistry. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 1897p. 289–298.

MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3–18, fev. 2013.

MICIELI, J. A.; NEWMAN, N. J.; BIOUSSE, V. The role of optical coherence tomography in the evaluation of compressive optic neuropathies. **Current Opinion in Neurology** Lippincott Williams and Wilkins, 1 fev. 2019.

MITORI, H. et al. Developing Stage-dependent Retinal Toxicity Induced by L - glutamate in Neonatal Rats. **Toxicologic Pathology**, p. 1–9, 2016.

MOJUMDER, D. K.; SHERRY, D. M.; FRISHMAN, L. J. Contribution of voltage-gated sodium channels to the b-wave of the mammalian flash electroretinogram. **Journal of Physiology**, v. 10, n. 2008, p. 2551–2580, 2020.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Processing of snake venom metalloproteinases: Generation of toxin diversity and enzyme inactivation. **Toxins**, v. 8, n. 6, 9 jun. 2016.

NICKLA, D. L.; WALLMAN, J. The multifunctional choroid. **Progress in Retinal and Eye Research**, mar. 2010.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segments of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 1–3, 2001.

OLAOBA, O. T. et al. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. **Toxicon**. Elsevier Ltd, 1 set. 2020.

OLIVEIRA, A. L. et al. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. **Nature Reviews Chemistry**, 10 jul. 2022.

PAES LEME, A. F. et al. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 4, p. 401–410, 1 abr. 2011.

PENHA, F. M. et al. Retinal and Ocular Toxicity in Ocular Application of Drugs and Chemicals – Part II: Retinal Toxicity of Current and New Drugs. **Ophthalmic Research**, v. 44, p. 205–224, 2010.

PERLMAN, I. Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques. **Documenta Ophthalmologica**, n. 118, p. 3–28, 2009.

PETIT, L.; PUNZO, C. Gene Therapy Approaches For The Treatment Of Retinal Disorders. **Discov Med**, v. 22, n. 121, p. 221–229, 2016.

PIERRU, A. et al. Occlusions veineuses rétinienes & Retinal vein occlusions. **Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction**, 2017.

PILLAI-KASTOORI, L.; SCHUTZ-GESCHWENDER, A. R.; HARFORD, J. A. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. **Analytical Biochemistry** Academic Press Inc., 15 mar. 2020.

PONSIOEN, T. L. et al. Collagen distribution in the human vitreoretinal interface. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 49, n. 9, p. 4089–4095, set. 2008.

PUJARI, A. Smartphone ophthalmoscopy: Is there a place for it? **Clinical Ophthalmology** Dove Medical Press Ltd, 2021.

QAMAR, Z. et al. Nano-Based Drug Delivery System: Recent Strategies for the Treatment of Ocular Disease and Future Perspective. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 13, n. 4, p. 246–254, 30 dez. 2019.

RAMSAMY, G.; ARUNAKIRINATHAN, M.; COOMBES, A. The essentials of funduscopy. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 78, n. 2, p. 28–32, 2017.

REGOLI, M. et al. The Peculiar Pattern of Type IV Collagen Deposition in Epiretinal Membranes. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 68, n. 2, p. 149–162, 1 fev. 2020.

REHAK, M.; WIEDEMANN, P. Retinal vein thrombosis: Pathogenesis and management. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, set. 2010.

REINHART, M. B. et al. Indocyanine Green :Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. **Surgical Innovation**, v. 23, n. 2, p. 166–175, 1 abr. 2016.

S, K. et al. Fluorescein Based Fluorescence Sensors for the Selective Sensing of Various Analytes. **Journal of Fluorescence** Springer, 1 set. 2021.

SCHWABENLAND, M. et al. Analyzing microglial phenotypes across neuropathologies: a practical guide. **Acta Neuropathologica** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 dez. 2021.

SELHORST, J. B.; CHEN, Y. The optic nerve. **Seminars in Neurology**, fev. 2009.

SOANS, K. G.; NORDEN, C. Shining a light on extracellular matrix dynamics in vivo. **Seminars in Cell and Developmental Biology** Elsevier Ltd, 1 dez. 2021.

SOFYANTORO, F. et al. Bibliometric Analysis of Literature in Snake Venom-Related Research Worldwide (1933–2022). **Animals**, v. 12, n. 16, p. 2058, 12 ago. 2022.

SPAIDE, R. F. et al. Optical coherence tomography angiography. **Progress in Retinal and Eye Research** Elsevier Ltd, 1 maio 2018.

SUN, B. et al. Retinal and Corneal Toxicity and Pharmacokinetic Analysis of Intraocular Injection of Ganciclovir in Rabbit Eyes. **Journal of Ophthalmology**, v. 2019, p. 1–15, 2019.

SUNAGA, A. et al. Reconstitution of Human Keloids in mouse skin. **Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open**, v. 5, n. 4, 2017.

THELWELL, C. Biological standards for potency assignment to fibrinolytic agents used in thrombolytic therapy. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 40, n. 2, p. 205–213, mar. 2014.

TSAI, C. et al. Ocular Drug Delivery: Role of Degradable Polymeric Nanocarriers for Ophthalmic Application. **Molecular Sciences**, v. 19, p. 1–20, 2018a.

VAN DIJK, E. H. C.; BOON, C. J. F. Serous business: Delineating the broad spectrum of diseases with subretinal fluid in the macula. **Progress in Retinal and Eye Research** Elsevier Ltd, 1 set. 2021.

VERHAAR, M. J. et al. Technetium-99m Radiolabeling Using a Phage-Derived Single-Chain Fv with a C-Terminal Cysteine. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 37, n. 5, p. 621–623, 1996.

WILLARD, N. K. et al. Proteomic identification and quantification of snake venom biomarkers in venom and plasma extracellular vesicles. **Toxins**, v. 13, n. 9, 1 set. 2021.

YADAV, I. et al. Vitreous substitutes: An overview of the properties, importance, and development. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 109, n. 8, p. 1156–1176, 1 ago. 2021.

ZHANG, L. et al. Ingestion of collagen hydrolysates skin chronological aging in an aged mouse model by increasing collagen synthesis. **Food and Function**, v. 2019- November, 2019.

ZOU, L. et al. Intraocular Pressure Changes: An Important Determinant of the Biocompatibility of Intravitreal Implants. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–9, 2011.

**ANEXOS**

---

## ANEXO I – Ofício de aprovação para experimentação animal pela Comissão de Ética No Uso de Animais



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da segurança da administração intravítrea da toxina Leuc-a e da ação trombolítica em modelo de oclusão de veia de retina em olhos de ratos**”, registrado com o nº **002/2018**, sob a responsabilidade de **Sílvia Ligório Fialho** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, em reunião do dia **20/10/2021**.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	21/10/2021 a 21/10/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratos Wistar)
Nº de animais	67
Peso/Idade	200g/ adultos
Sexo	Machos
Origem	Biotério de Criação/Faculdade de Farmácia UFMG

#### Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste parecer e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-FUNED o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e nas publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008 e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, ou seja, até **21/11/2022**.

Belo Horizonte, 21 de outubro de 2021.

## ANEXO II – Comprovante de cadastro do projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN)



Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão**  
**Cadastro nº AFDCC7C**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AFDCC7C**  
 Usuário: **Silvia Ligorio Fialho**  
 CPF/CNPJ: **035.240.096-03**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

### Espécie

**Bothrops leucurus**

Título da Atividade: **Administração intravítrea da toxina Leuc-a incorporada em lipossomas: estudos de segurança e atividade em modelo animal de oclusão de veia de retina**

### Equipe

<b>Silvia Ligorio Fialho</b>	<b>FUNED</b>
<b>Luciana Maria Silva</b>	<b>Funed</b>
<b>Armando da Silva Cunha Junior</b>	<b>UFMG</b>
<b>Eladio Oswaldo Flores Sanchez</b>	<b>Funed</b>

Data do Cadastro: **15/03/2018 22:43:25**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:58** de **04/09/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**

