

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Cibele Rodrigues Toledo

**ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTREA DE TRITERPENOS COMO POTENCIAL
ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA UVEÍTE**

Belo Horizonte - MG

2022

Cibele Rodrigues Toledo

**ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTREA DE TRITERPENOS COMO POTENCIAL
ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA UVEÍTE**

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

Orientador:
Prof. Dr. Armando da Cunha Silva Júnior

Coorientador:
Dr. Vinícius Viana Pereira

Belo Horizonte - MG

2022

T649a Toledo, Cibele Rodrigues.
Administração intravítrea de triterpenos como potencial alternativa para o tratamento da uveíte [recurso eletrônico] / Cibele Rodrigues Toledo. – 2022.
1 recurso eletrônico (122 f. : il.) : pdf.

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.
Coorientador: Vinícius Viana Pereira.

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. Uveíte – Teses. 2. Triterpenos – Teses. 3. Olhos – Doenças – Teses. 4. Medicamentos – Administração – Teses. 5. Olhos – Infecções – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Pereira, Vinícius Viana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 617.713



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ADMINISTRAÇÃO INTRAVÍTEA DE TRITERPENOS COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA UVEÍTE"

CIBELE RODRIGUES TOLEDO

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. Carolina Paula de Souza Moreira
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

Profa. Dra. Gracielle Ferreira Andrade
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Dra. Ana Luíza Chaves Maia
CTC Vacinas - UFMG

Dr. Vinícius Viana Pereira
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Renes de Resende Machado
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

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

Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Gracielle Ferreira Andrade, Usuária Externa**, em 09/01/2023, às 14:45, 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 **Armando da Silva Cunha Junior, Professor do**



Magistério Superior, em 09/01/2023, às 16:38, 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 **Renes de Resende Machado, Professor do Magistério Superior**, em 10/01/2023, às 10:12, 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 **Ana Luiza Chaves Maia, Usuário Externo**, em 12/01/2023, às 11:05, 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 **Vinicius Viana Pereira, Farmacêutico-Habilitação**, em 16/01/2023, às 13:00, 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 Paula de Souza Moreira, Usuário Externo**, em 06/02/2023, às 09:53, 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, informando o código verificador 2007750 e o código CRC **CBC2EB4D**.

Dedico este trabalho aos meus pais, que são minha maior motivação!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fortalecer durante toda a caminhada, me animando nos momentos de dificuldade, me dando sabedoria para conduzir o meu caminho e pelas muitas conquistas alcançadas.

Ao meu pai, Hilarino (*in memoriam*), pelo incentivo, apoio e amor incondicionais e por me ensinar a persistir em meus objetivos.

À minha mãe, Rilza, por ser uma verdadeira mestra em minha vida, pelos ensinamentos valiosos e apoio em todos os momentos.

Ao professor Dr. Armando da Silva Cunha Junior que é uma fonte de inspiração. Obrigada pela oportunidade, confiança, por me dar autonomia para me desenvolver como profissional.

Ao Doutor Vinícius Viana Pereira pela coorientação, confiança, apoio e contribuição na realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e ao programa de Pós-Graduação pela oportunidade.

Aos meus queridos companheiros de laboratório pelos ensinamentos, sugestões, companheirismo, momentos de risadas, descontração, cafés e por tornarem o dia a dia mais agradável.

À professora Dra. Lirlândia Pires e ao professor Dr. Renes Machado pela colaboração e por disponibilizarem seus laboratórios para a realização de alguns experimentos.

Ao Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores, especialmente à Fernanda, pela ajuda e disponibilidade nas análises por citometria de fluxo.

Ao professor Dr. Daniel Victor e à Dra. Sarah Cenachi pela ajuda e disponibilidade nas avaliações oftalmológicas.

Às professoras do Departamento de Química da UFMG, Lucienir Duarte e Grasiely Sousa pela colaboração e doação da matéria-prima.

Às Doutoradas Mayara Brandão, Brenda Castro, Lays Dourado, Raquel Gregório, Carolina Nunes e Sílvia Ligório pelas colaborações.

Ao Batista, Adelaide e Clarete sempre tão solícitos e dispostos a ajudar.

A todos do *Institut de la Vision*, em Paris, especialmente à Pesquisadora Cécile Delarasse pela oportunidade e confiança durante o doutorado sanduiche.

A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e tranquilizaram.

Aos professores e colegas do LTF e ao Marton pela colaboração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A uveíte é uma doença ocular inflamatória que afeta tanto o trato uveal quanto as estruturas adjacentes, sendo considerada uma das principais causas da perda irreversível da visão e a terceira maior causa de cegueira no mundo. O protocolo de tratamento inicial da uveíte não infecciosa baseia-se na administração de corticosteroides, para supressão da resposta inflamatória. Entretanto, o uso a longo prazo dessas terapias está associado a graves efeitos adversos. Dessa forma, a investigação de novos agentes anti-inflamatórios com uso potencial no tratamento de uveítes tem sido estimulado. Dentro desse panorama, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiangiogênica e a segurança da administração intravítrea dos triterpenos (TPs) friedelina, friedelinol, lupenona e lupeol, bem como investigar a eficácia terapêutica do lupeol e da lupenona como agentes anti-inflamatórios por meio de ensaio *in vitro* e em modelo de uveíte experimental induzida pelo bacilo de Calmette-Guérin (BCG) em ratos Wistar. Face à ausência de estudos relacionados à aplicação oftálmica dos TPs, o ensaio de toxicidade em linhagem celular do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) auxiliou na estimativa da faixa de dose a ser empregada em ensaios *in vivo*. Por meio do modelo da membrana corioalantoica de embrião de galinha, observou-se que os TPs de esqueleto lupano apresentaram elevado potencial antiangiogênico, sendo comparável ao do bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$. Além disso, notou-se que na concentração 100 $\mu\text{mol/L}$, os lupoanos apresentaram a melhor relação entre dose aplicada e resultado obtido. Empregando-se o exame eletrorretinográfico e a avaliação histológica, que são parâmetros importantes na avaliação de segurança da administração intravítrea de novos fármacos, FA, FL e LL (na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$) e LA (em concentrações até 500 $\mu\text{mol/L}$) não apresentaram indícios de efeitos tóxicos sob a retina, por um período de 15 dias, sugerindo segurança na aplicação oftálmica dos TPs. Diante dos resultados obtidos, prosseguiu-se com a investigação da atividade anti-inflamatória dos lupoanos LL e LA (100 $\mu\text{mol/L}$) em tecidos oculares, utilizando-se modelos *in vitro* e *in vivo*. Por meio do ensaio *in vitro*, foi demonstrado que os lupoanos reduziram os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8, liberadas pelas células ARPE-19 em resposta à estimulação pelo lipopolissacarídeo, sendo essa diminuição comparável ao grupo que recebeu tratamento com o padrão dexametasona. De forma semelhante, o tratamento com injeção intravítrea dos lupoanos em ratos com uveíte, atenuou a

gravidade da inflamação, tanto nos segmentos anteriores, quanto posteriores dos olhos, o que foi confirmado por meio de análises clínica, eletrorretinográfica, histopatológica e imunológica. Pode-se inferir, portanto, que a administração intravítrea de lupanos LA e LL 100 $\mu\text{mol/L}$ apresenta-se como uma terapia promissora para o manejo da uveíte.

Palavras-chave: uveíte; triterpenos; lupeol; lupenona; friedelinol; friedelina; anti-inflamatório; eletrorretinografia.

ABSTRACT

Uveitis is an ocular inflammatory disease affecting both the uveal tract and adjacent structures and is considered a major cause of irreversible vision loss and the third leading cause of blindness worldwide. The initial treatment protocol for non-infectious uveitis is based on the administration of corticosteroids to suppress the inflammatory response. However, long-term use of these therapies is associated with serious adverse effects. Thus, the investigation of new anti-inflammatory agents with potential use in the treatment of uveitis has been stimulated. This study aimed to evaluate the antiangiogenic activity and the safety of intravitreal administration of the triterpenes (TPs) friedelin, friedelinol, lupenone, and lupeol, as well as to investigate the therapeutic efficacy of lupeol and lupenone as anti-inflammatory agents through *in vitro* assay and a model of experimental uveitis induced by *bacillus Calmette-Guérin* (BCG) in Wistar rats. Due to the absence of studies concerning the ophthalmic application of TPs, the toxicity assay in a retinal pigmented epithelium cell line (ARPE-19) helped to estimate the dose range to be employed in *in vivo* assays. Using the chicken embryo chorioallantoic membrane model, TPs with lupane skeleton showed high antiangiogenic potential, being comparable to that of bevacizumab 1 $\mu\text{mol/L}$. Moreover, lupanes at 100 $\mu\text{mol/L}$ presented the best ratio between the applied dose and obtained result. Through electroretinographic exam and histological evaluation, which are important parameters in the safety assessment of intravitreal administration of new drugs, FA, FL, and LL (at 100 $\mu\text{mol/L}$) and LA (at concentrations up to 500 $\mu\text{mol/L}$) showed no evidence of toxic effects on the retina for 15 days, suggesting the safety in the ophthalmic application of TPs. In the sequence, the anti-inflammatory activity of LL and LA (100 $\mu\text{mol/L}$) was further investigated in ocular tissues, using *in vitro* and *in vivo* models. Through the *in vitro* assay, lupanes reduced the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, released by ARPE-19 cells in response to stimulation by lipopolysaccharide, and this decrease is comparable to the group that received treatment with the standard dexamethasone. Similarly, the intravitreal injection of the lupanes in rats with uveitis attenuated the severity of inflammation, in both anterior and posterior segments of the eyes, which was confirmed by clinical, electroretinographic, histopathological, and immunological analyses. Therefore, the intravitreal administration of LA and LL at 100 $\mu\text{mol/L}$ is a promising therapy for the management of uveitis.

Keywords: uveitis; triterpenes; lupeol; lupenone; friedelinol; friedelina; anti-inflammatory; electroretinography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do olho, com inserções mostrando a estrutura histológica da córnea, íris e corpo ciliar e retina.....	25
Figura 2: Arquitetura celular da retina.....	29
Figura 3: Exemplo de olho apresentando sinais de uveíte.....	30
Figura 4: Classificação da uveíte de acordo com o local da inflamação.....	32
Figura 5: Sinais de uveíte indicados pela seta branca: (a) rubor ciliar; (b) precipitados ceráticos; (c) sinequia; (d) edema corneano; (e) ceratopatia em banda; (f) hipópio.....	35
Figura 6: Sinais de uveíte indicados pela seta branca: (a) edema macular cistóide; (b) vasculite retiniana; (c) isquemia e/ou hemorragia retiniana; (d) neovascularização retiniana; (e) descolamento de retina.....	36
Figura 7: Patogênese da uveíte.....	37
Figura 8: Fração de produtos naturais aprovados, de acordo com a fonte, no período de 1930 a 2013.....	38
Figura 9: Estrutura química dos terpenos (A) FA; (B) FL; (C) LA; (D) LL.....	39
Figura 10: Esquema da placa utilizada no estudo de citotoxicidade, demonstrando os poços: controle, tris-base e as concentrações dos TPs (FA, FL, LA, LL)	49
Figura 11: Imagens sequenciais do procedimento do ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (A) incubação dos ovos; (B) abertura circular na região da casca; (C) aplicação da amostra sob o disco de celulose (indicado pela seta); (D) fotografias das membranas.....	52
Figura 12: Exame de eletrorretinografia. (A) Cúpula de Ganzfeld. (B) Posicionamento do animal, dos eletrodos e da lente.....	54
Figura 13: Viabilidade de células da linhagem ARPE-19, após 48h, mediante a presença de concentrações crescentes (5-640 $\mu\text{mol/L}$) dos TPs (A) FA;(B) FL; (C) LA; (D) LL.....	57
Figura 14: Curva da viabilidade celular em linhagem ARPE-19 após tratamento com LA (A) e LL (B) por 48 h.....	58
Figura 15: Parâmetros avaliados na vasculatura corioalantoica.....	60
Figura 16: Imagens representativas das membranas corioalantoicas	

submetidas ao tratamento com os TPs nas doses de 1000 e 100 $\mu\text{mol/L}$, fotografadas no aumento de 20x	62
Figura 17: Exemplos de formas de ondas obtidas em modelos murinos de acordo com o estímulo emitido.....	64
Figura 18: Perfil eletrorretinográfico nas condições escotópica - 0,01 cd.s.m^{-2} (A - D) e 3,0 cd.s.m^{-2} (E - H) nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: FA (A e E); FL (B e F); LA (C e G); LL (D e H).....	65
Figura 19: Amplitudes das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: (A) FA; (B) FL; (C) LA; (D) LL.....	66
Figura 20: Parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton (V_{max} , K, n) nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: (A) FA; (B) FL; (C) LA; (D) LL.....	68
Figura 21: Razão $B_{\text{amp}}/A_{\text{amp}}$ nos tempos 7 e 15 dias após injeção intravítrea dos TPs, em condição escotópica e intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m^{-2}	69
Figura 22: Área sob a curva dos potenciais oscilatórios nos tempos 7 e 15 dias após injeção intravítrea dos TPs, em condição escotópica e intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m^{-2}	70
Figura 23: Perfil eletrorretinográfico da resposta fotópica na intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m^{-2} (A-D) e flicker de 30 Hz (E-H) nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: FA (A e E); FL (B e F); LA (C e G); LL (D e H). (I) amplitude da onda b na condição fotópica com luminância de 3,0 cd.s.m^{-2} ; (J) diferença do tempo de pico entre olhos controles e experimentais mediante flicker de 30 Hz.....	71
Figura 24: Imagens representativas das retinas de rato coradas por HE 15 dias após a injeção intravítrea dos TPs.....	73
Figura 25: Esquema do protocolo utilizado para indução de uveíte pelo BCG em ratos.....	81
Figura 26: Princípio do ensaio LEGENDplex®.....	85
Figura 27: Efeito do tratamento prévio com LL e LA na produção de citocinas (IL-6 e IL-8) pelas células ARPE-19 estimuladas com LPS.....	86
Figura 28: Imagens representativas da câmara anterior dos olhos dos	

animais 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.....	88
Figura 29: Imagens representativas do fundo de olho dos animais 15 dias após a indução da uveíte.....	89
Figura 30: Perfil eletrorretinográfico nas condições escotópica - 0,01 cd.s.m ⁻² (A-C) e 3,0 cd.s.m ⁻² (D-F) nos tempos 3, 7 e 15 dias após indução da uveíte.....	90
Figura 31: Amplitudes das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte....	91
Figura 32: Parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton (V_{max} , K, n) nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.....	92
Figura 33: Tempo implícito das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte....	93
Figura 34: Área sob a curva dos OPs, em condição escotópica e intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m ⁻²	94
Figura 35: Perfil eletrorretinográfico da resposta fotópica na intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m ⁻² (A - C) e flicker de 30 Hz (D - F) nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.....	95
Figura 36: Variações percentuais da amplitude e tempo implícito médio da onda b em condições fotópica com luminância de 3,0 cd.s.m ⁻² (A e B) e mediante flicker de 30 Hz (C e D) nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.....	96
Figura 37: Fotomicrografias representativas das principais estruturas (córnea, corpo ciliar, retina e coróide) afetadas pelo processo inflamatório obtidas nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.....	97
Figura 38: Avaliação da infiltração de neutrófilos e macrófagos na retina nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação das uveítes de acordo com o grupo de padronização da nomenclatura de uveítes SUN.....	32
Quadro 2: Diluições de TPs para realização dos ensaios em membrana corioalantoica de embrião de galinha.....	50
Quadro 3: Componentes da solução de extração de citocinas	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARPE- 19	Linhagem do epitélio pigmentar da retina
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
AUC	Área sob a curva (AUC, <i>Area Under the Curve</i>)
BCG	<i>Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin</i>
BHR	Barreira hemato-retiniana
BSA	Albumina do soro bovino
bFGF	Fator básico de crescimento dos fibroblastos
CAM	Ensaio em membrana corialantoica de embrião de galinha
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CGen	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EPR	Epitélio pigmentar da retina
ERG	Eletrorretinograma
FA	Friedelina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	Friedelinol
HE	Hematoxilina-eosina
HETAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
iNOS	Enzima óxido nítrico-sintase induzida

IV	Infravermelho
ISCEV	<i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
K	Constante de semi-saturação
LA	Lupenona
LL	Lupeol
LPS	Lipopolissacarideo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MD	Maculopatia diabética
MPO	Mieloperoxidase
N	Coeficiente de inclinação sigmoidal
NAG	N-acetilglicosaminidase
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
RMN	Ressonância magnética nuclear
OPs	Potenciais oscilatórios
PBS	Tampão salina fostato
PMN	Células polimorfonucleares
PSA	Penicilina - estreptomicina -anfotericina B
RD	Retinopatia diabética
SFB	Soro fetal bovino
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SRB	Sulforrodamina B

SUN	Grupo de padronização da nomenclatura das uveítes (<i>The Standardization of Uveitis Nomenclature working group</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TPs	Terpenos
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
V _{max}	Amplitude máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 O olho humano	24
2.2 Uveíte	30
2.2.1 Aspectos fisiopatológicos	36
2.2.2 Tratamento farmacológico da uveíte	39
2.3 Substâncias naturais na oftalmologia	41
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA, SEGURANÇA E TOXICIDADE DA APLICAÇÃO OCULAR DOS TRITERPENOS	45
1 MATERIAIS	46
1.1 TPs isolados de plantas do gênero <i>Maytenus</i>	46
1.2 Reagentes e outros materiais	46
1.3 Equipamentos e acessórios	47
1.4 Animais	47
2 MÉTODOS	48
2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade dos TPs sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)	48
2.1.1 Preparo das soluções estoques a 5000 µmol/L	48
2.1.2 Ensaio Colorimétrico da Sulforrodamina B	48
2.2 Avaliação da atividade antiangiogênica dos TPs em membrana corioalantoica de embrião de galinha	50
2.2.1 Preparo das suspensões dos TPs	50
2.2.2 Ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha	51
2.3 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas dos TPs em modelo <i>in vivo</i>	53

2.3.1 Preparo das suspensões dos TPs.....	53
2.3.2 Administração intravítrea.....	53
2.3.3 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma.....	54
2.3.4 Avaliação histológica.....	55
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1 Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade dos TPs sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19).....	56
3.2 Avaliação da atividade antiangiogênica dos TPs em membrana corioalantoica de embrião de galinha.....	59
3.3 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas dos TPs em modelo <i>in vivo</i>	63
3.3.1 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma.....	63
3.3.2 Avaliação histológica.....	72
4 CONCLUSÃO.....	74
CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO LUPEOL E LUPENONA EM MODELO DE UVEÍTE EXPERIMENTAL.....	75
1 MATERIAIS.....	76
1.1 TPs isolados de plantas do gênero <i>Maytenus</i>	76
1.2 Reagentes e outros materiais.....	76
1.3 Equipamentos e acessórios.....	77
1.4 Animais.....	77
2 MÉTODOS.....	78
2.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19).....	78
2.1.1 Preparo das soluções estoques a 4000 µmol/L.....	78
2.1.2 Avaliação do efeito dos lupanos sobre a produção de citocinas pelas células ARPE-19 após estímulo com LPS.....	78
2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em modelo experimental de uveíte induzida por BCG em ratos.....	80
2.2.1 Preparo da suspensão de sensibilização (BCG 2,6 mg/mL).....	80

2.2.2 Preparo das suspensões tratamento.....	80
2.2.3 Indução da uveíte.....	81
2.2.4 Avaliação clínica.....	82
2.2.5 Avaliação indireta da presença de macrófagos e neutrófilos	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19).....	84
3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em modelo experimental de uveíte induzida por BCG em ratos.....	87
3.2.1 Avaliação clínica.....	87
3.2.2 Avaliação eletrorretinográfica	89
3.2.3 Avaliação histológica.....	96
3.2.4 Avaliação indireta da presença de macrófagos e neutrófilos	98
4 CONCLUSÃO	101
5 PERSPECTIVAS.....	102
6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO.....	103
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXOS	117
ANEXO I – Certificado de aprovação CEUA 300/2018.....	117
ANEXO II – Certificado de aprovação CEUA 221/2019	118
ANEXO III – Certidões de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) para acesso e utilização de produtos naturais das espécies de <i>Maytenus</i>.....	119
ANEXO IV – Publicação do Capítulo I no periódico Documenta Ophthalmologica (2021).....	121
ANEXO V – Publicação de parte do Capítulo II no periódico Biomedicine & Pharmacotherapy (2021).....	122
ANEXO VI – Comprovante de realização de estágio doutoral no exterior financiado com a bolsa CAPES/PrInt (2020).....	123

1 INTRODUÇÃO

As doenças oculares inflamatórias representam um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de deficiência visual e cegueira em todo o mundo. A uveíte compreende um grupo de doenças caracterizadas por distúrbios inflamatórios do trato uveal (íris, corpo ciliar, coróide) e de tecidos adjacentes, tais como retina, vítreo e nervo óptico, sendo considerada uma doença de importante impacto socioeconômico, uma vez que acomete, sobretudo, indivíduos em idade economicamente ativa (AIRODY *et al.*, 2016; ROSENBAUM *et al.*, 2019; TOLEDO; PAIVA; *et al.*, 2021; TRIVEDI; KATELARIS, 2019).

De acordo com a etiologia, as uveítes podem ser classificadas em infecciosas e não-infecciosas, podendo, com frequência, representar a primeira manifestação de doenças sistêmicas (DESCHENES *et al.*, 2008). O tratamento inicial da uveíte não infecciosa consiste na administração de corticosteroides, para controle imediato da inflamação intraocular. Além disso, agentes imunomoduladores podem ser adicionados como poupadores de esteroides, em condições crônicas e/ou recidivas (NGUYEN, Q. D. *et al.*, 2013). Entretanto, o uso a longo prazo dessas terapias está associado a efeitos adversos graves, tais como catarata e glaucoma (para corticosteroides) e aumento da suscetibilidade à infecção (para corticosteroides e agentes imunomoduladores) (MUDUMBA *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2021). Dessa forma, novas condutas farmacoterapêuticas com melhor perfil de segurança mostram-se necessárias e as plantas medicinais compreendem um recurso em potencial para a obtenção de novas substâncias, tais como os triterpenos pentacíclicos (TOLEDO *et al.*, 2020).

Os triterpenos pentacíclicos são metabólitos secundários de ampla distribuição no reino vegetal e são, frequentemente, objetos de pesquisas farmacológicas e fitoquímicas. Dentre essas substâncias, destacam-se os terpenos derivados de esqueletos friedelanos (friedelina e friedelinol) e lupanos (lupenona e lupeol) (NAZARUK; BORZYM-KLUCZYK, 2014).

Embora existam vários relatos de atividades biológicas atribuídas a esses triterpenos, ainda não há estudos avaliando a segurança e a aplicabilidade oftálmica dessas substâncias. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiangiogênica e a segurança da administração intravítrea dos triterpenos friedelina, friedelinol, lupenona e lupeol, bem como investigar a eficácia terapêutica do lupeol e

da lupenona como agentes anti-inflamatórios por meio de ensaio *in vitro* e em modelo murino de uveíte experimental induzida pelo bacilo de Calmette-Guérin - BCG.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

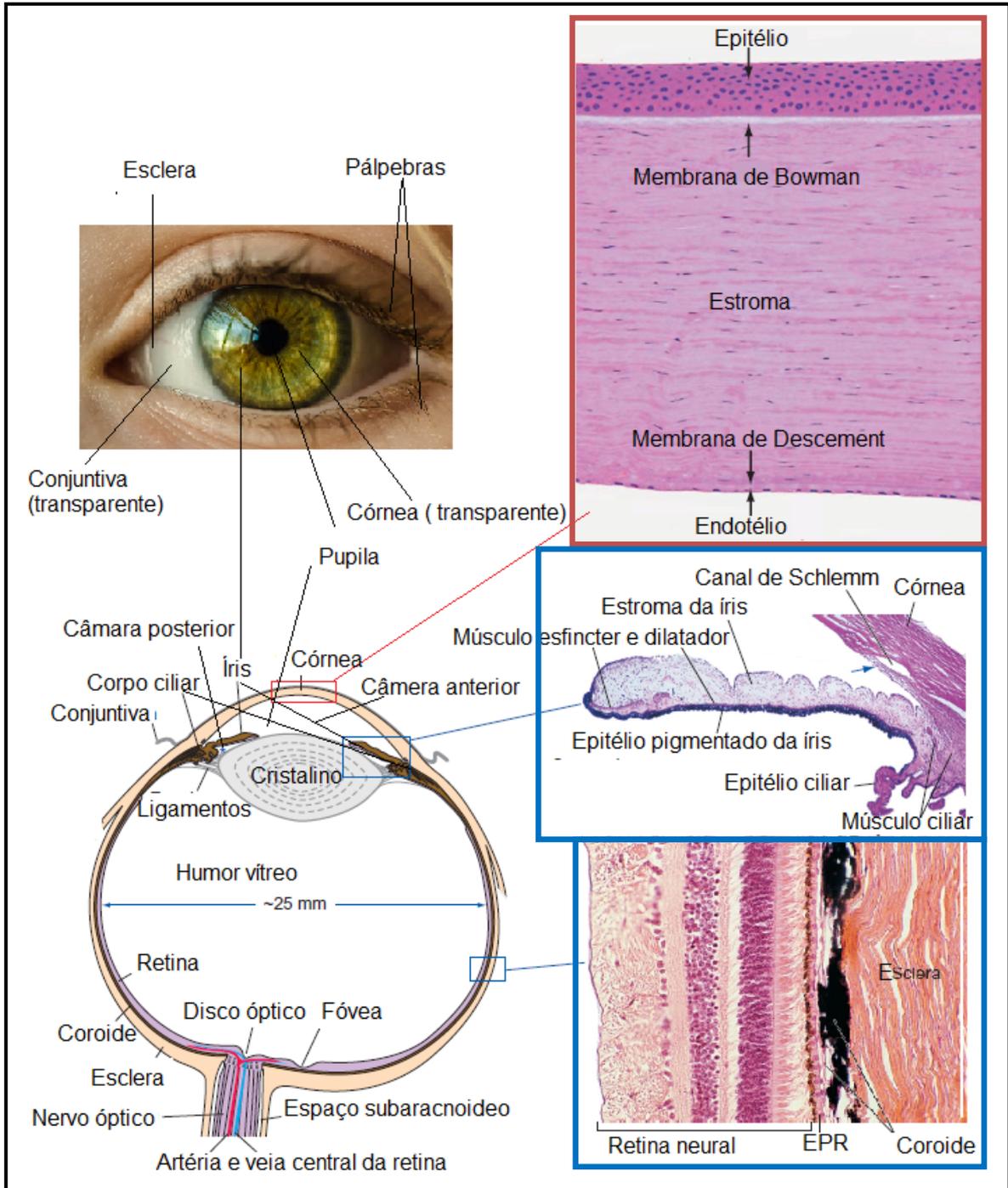
2.1 O olho humano

Um dos órgãos mais complexos do corpo humano são os olhos. O olho humano é um órgão par, apresentando-se como uma estrutura globular, com um diâmetro aproximado de 25 mm, volume de 6,5 mL e uma massa de cerca de 7,5 g, o que corresponde a menos de 0,05% da massa corporal total (CARLSON, 2019; FORRESTER *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2014). Está protegido pelas pálpebras e órbita (cavidade óssea no crânio) (BRUTON, *et.al.*, 2012).

O bulbo ocular é constituído por três túnicas concêntricas, uma lente (cristalino) e dois líquidos (humor aquoso e humor vítreo). A túnica externa ou fibrosa é formada pela córnea e esclera. Já a túnica média, também chamada de úvea, é constituída pela íris, corpo ciliar e coroide; trata-se de uma túnica bastante vascularizada. A túnica interna refere-se à retina, que é composta por duas partes: o estrato nervoso e estrato pigmentado (CARLSON, 2019).

Além disso, o bulbo ocular pode também ser dividido de acordo com o critério anatômico, em segmentos anterior e posterior, sendo o cristalino, o marco anatômico nesta divisão. O segmento anterior é composto pela córnea, conjuntiva, íris, corpo ciliar e cristalino. Enquanto o segmento posterior é formado pela esclera, corpo vítreo, retina, coroide e nervo óptico (KIM *et al.*, 2014; SHEN; LU; HUGHES, 2018). As principais estruturas estão representadas na figura 1.

Figura 1: Estrutura do olho, com inserções mostrando a estrutura histológica da córnea, íris e corpo ciliar e retina.



Fonte: Adaptado de CARLSON, 2019.

A córnea é um tecido transparente, fino e avascular. Ela está organizada em cinco camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (figura 1). A transparência é uma propriedade muito importante, pois atua como meio óptico, permitindo a passagem de luz para o interior do olho. Além disso, a camada epitelial hidrofóbica da córnea funciona como uma barreira contra a entrada de substâncias estranhas, incluindo fármacos (BRUTON, *et.al.*, 2012; TOLEDO, 2018). É importante ressaltar que substâncias lipofílicas apresentam uma maior permeabilidade pela camada epitelial do que substâncias hidrofílicas (PAIVA, 2019).

A conjuntiva é uma membrana fina e transparente que reveste o interior das pálpebras e cobre a superfície anterior do olho até a córnea. Ela é formada por duas camadas: epitelial e estroma, sendo que na camada epitelial estão localizadas as células responsáveis pela produção de mucina (componente do filme lacrimal), enquanto no estroma encontram-se as glândulas que contribuem para a formação das camadas aquosa e lipídica do filme lacrimal. Dessa forma, assim como a córnea, a conjuntiva, por meio do filme lacrimal, é capaz de proteger o olho contra a entrada de xenobióticos (DOURADO, 2021; LOFTSSON *et al.*, 2008). Entretanto, ao contrário da córnea, as junções que formam o epitélio conjuntival são mais largas e, portanto, permitem a passagem de moléculas de maiores tamanhos (exemplo: proteínas). Além disso, a conjuntiva apresenta uma área bastante vascularizada, o que permite que as moléculas absorvidas por meio dessa membrana cheguem à circulação sistêmica (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015; PAIVA, 2019).

A íris é uma estrutura fina, circular e pigmentada. Ela está suspensa no interior do humor aquoso, entre o cristalino e a córnea. Assim, o espaço entre a córnea e íris é denominado câmara anterior, enquanto entre a íris e o cristalino, câmara posterior. A região central da íris é denominada pupila, uma estrutura responsável por controlar a quantidade de luz que entra no olho. Dessa forma, em resposta à pouca luz do ambiente ou devido a um aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático, há uma dilatação da pupila (midríase), por meio do músculo dilatador. E quando o sistema parassimpático é ativado, ocorre uma redução do diâmetro da pupila (miose) por meio de contrações do músculo esfíncterico (BRUTON, *et.al.*, 2012; SHEN; LU; HUGHES, 2018; TOLEDO, 2018).

O corpo ciliar é dividido em duas regiões: parte pregueada (ou anterior) e a parte plana (ou posterior). Essa estrutura é responsável pela acomodação visual

(por meio do músculo ciliar) e pela secreção de humor aquoso, um líquido claro, transparente, de consistência aquosa e que está envolvido na nutrição da córnea e cristalino, além da regulação da pressão interna do olho. O humor aquoso está presente sob uma leve pressão (15 mmHg acima da pressão atmosférica), e isso mantém a firmeza e a curvatura da córnea. Há um equilíbrio delicado entre sua produção (pelo corpo ciliar) e remoção (por meio do canal de Schlemm e pela rede trabecular) (CARLSON, 2019; DOURADO, 2021; TOLEDO, 2018).

O cristalino ou lente é uma estrutura biconvexa, transparente, avascular e gelatinosa, que está situada atrás da íris e é anexa ao corpo ciliar, por meio dos ligamentos suspensórios. O cristalino é formado por uma rede de fibras elásticas, o que o torna flexível e lhe permite modificar seu formato (acomodar-se), para focalizar objetos em diferentes distâncias (CARLSON, 2019; DOURADO, 2021; TOLEDO, 2018).

A esclera (ou esclerótica) é a parte branca do bulbo ocular. Essa estrutura é formada por proteoglicanos e fibras de colágeno bastante resistentes. A esclera tem como função proteger as estruturas internas do bulbo ocular, representando uma barreira anatômica à difusão de macromoléculas, sobretudo às de caráter lipofílico. Além disso, a esclera é responsável por manter a estrutura esférica do globo ocular, mesmo sob a variação de pressão ou ação de músculos adjacentes (internos ou externos) (CARLSON, 2019; COSTANZO, 2014; DOURADO, 2021; TOLEDO, 2018).

O corpo vítreo é preenchido pelo humor vítreo, que é uma substância gelatinosa composta por água, colágeno tipo II, ácido hialurônico, proteoglicanos e várias macromoléculas, como a glicose, ácido ascórbico, aminoácidos e alguns sais inorgânicos. O vítreo está localizado entre o cristalino e a retina, e é responsável por manter o formato do olho, atenuar os impactos sofridos no globo ocular e evitar o deslocamento de retina (BRUTON, *et.al.*, 2012; DOURADO, 2021; LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001; TOLEDO, 2018).

A coroide está situada entre a esclera e a retina e estende-se do corpo ciliar ao nervo óptico. Trata-se de uma camada vascularizada e inervada, sendo responsável pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes às células da retina (HUANG, D.; CHEN; RUPENTHAL, 2017).

A retina é uma estrutura fina e transparente formada por neurônios organizados, células gliais e vasos sanguíneos. Compreende a porção mais interna do globo ocular, estando sua parte externa ligada à membrana de Bruch e a interna,

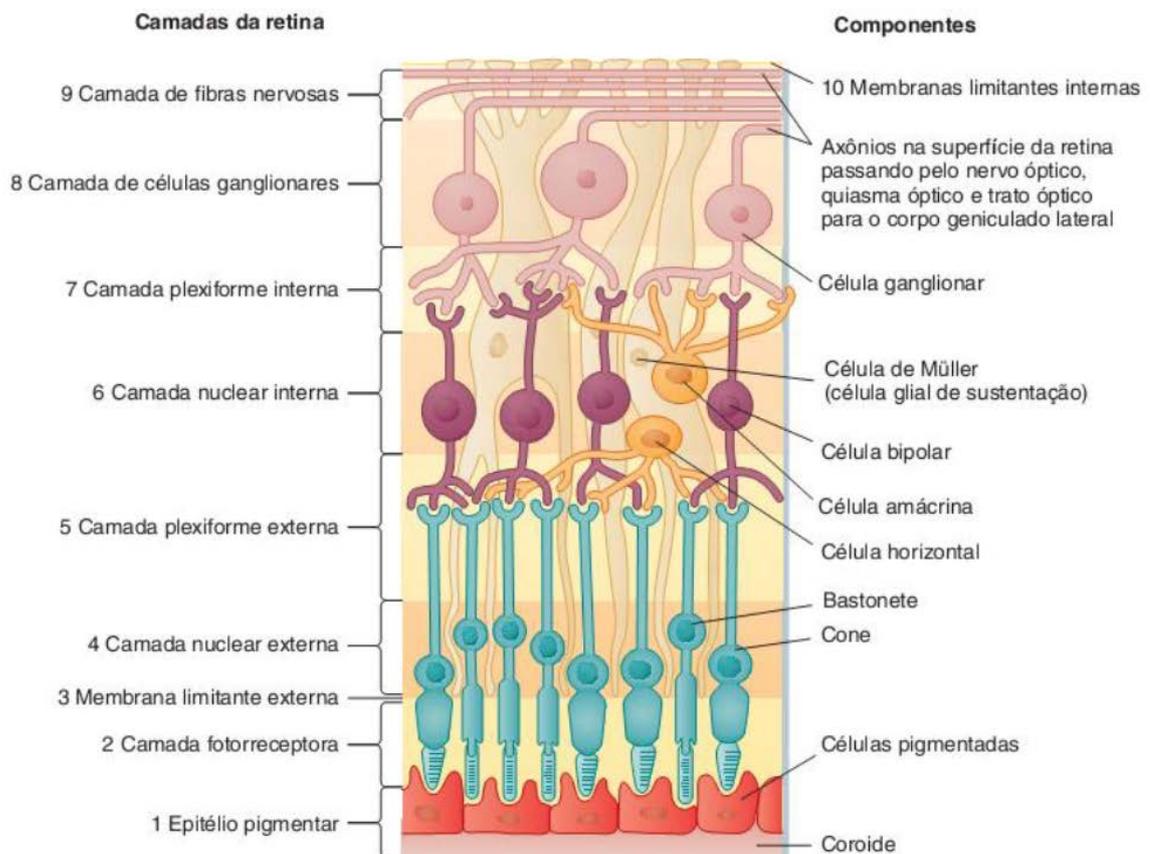
ao vítreo. A retina é formada por duas regiões: o epitélio pigmentado da retina (EPR) e a retina neural (FORRESTER *et al.*, 2016).

O EPR é a porção mais externa (ligado à membrana de Bruch), formada por uma monocamada estratificada de células cuboides pigmentadas. O EPR e os vasos da retina formam a barreira hemato-retiniana (BHR), promovendo a separação entre a porção neurosensorial da retina e a circulação sistêmica, o que representa um controle ao fluxo de fluidos, macromoléculas e metabólitos. Dessa forma, a BHR restringe a entrada de moléculas tóxicas, água e componentes do plasma na retina, além de eliminar, por transporte ativo e passivo, várias substâncias presentes no vítreo (CASTRO, 2020). Outras funções do EPR incluem: manutenção da adesão da retina neurosensorial, fagocitose de cones e bastonetes, absorção da luz, transporte e armazenamento de metabólitos e vitaminas (em especial vitamina A). O EPR está em íntimo contato com os segmentos externos da camada neuronal da retina (FORRESTER *et al.*, 2016; PAIVA, 2019)

A porção neurosensorial é responsável pelo processo da foto-transdução, que compreende a detecção de fótons, processamento das informações da luz e tradução em impulsos elétricos para o nervo óptico (nervo mielinizado) e, em seguida, para o cérebro, onde serão interpretados por meio da formação de imagens (BRUTON, *et.al.*, 2012).

A retina neural pode ser dividida em nove camadas, sendo elas: fotorreceptores; membrana limitante externa; nuclear externa (composta por corpos celulares de fotorreceptores e fibras de conexão); plexiforme externa (local de formação sináptica entre os fotorreceptores e as células bipolares); nuclear interna (células horizontais, bipolares, amácrinas e de Müller); plexiforme interna (há formações de conexões sinápticas entre o axônio das células bipolares e os dendritos das células ganglionares); células ganglionares; fibras nervosas; membrana limitante interna (separação entre retina e corpo vítreo) (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015). A organização em camadas da retina pode ser visualizada na figura 2.

Figura 2: Arquitetura celular da retina.



Fonte: Adaptado de KOEPPEN, et al., 2009 e PAIVA, 2015.

Ressalta-se que a camada de fotorreceptores é formada por dois tipos de células nervosas: os bastonetes e cones. A função dos bastonetes é a percepção do brilho, contraste e movimento, portanto, são responsáveis pela visão preto-e-branco em condições de baixa luminosidade. Já os cones são responsáveis pela resolução da imagem em cores. Existem cerca de 120 milhões de bastonetes e 7 milhões de cones em toda a retina humana. A densidade dessas células varia de acordo com a região da retina (GUYTON et al., 2011). Quanto mais próximo da fóvea, maior será a densidade de bastonetes, entretanto não há bastonetes na fóvea. Já os cones estão dispostos, em sua maioria, na fóvea; à medida que se distanciam dessa região, sua densidade de distribuição diminui de forma drástica. A fóvea compreende uma depressão central da mácula. Portanto, a mácula é uma região que, devido à elevada densidade de fotorreceptores, apresenta alta sensibilidade, correspondendo

à porção em que a acuidade visual apresenta a maior nitidez (QUEIROZ; QUEIROZ JUNIOR; QUEIROZ, 2010).

Dessa forma, faz-se necessário ressaltar que a retina é uma peça-chave no fenômeno da visão. Sendo assim, afecções que acometem essa estrutura, como presença de processos inflamatórios, infecciosos e de neovascularização, decorrentes de condições patológicas, como a degeneração macular relacionada à idade, retinopatia diabética e uveíte, constituem um grande risco à integridade funcional da retina e, portanto, podem comprometer, progressivamente, a função visual e culminar em cegueira.

2.2 Uveíte

A uveíte (figura 3) é uma doença inflamatória que afeta tanto o trato uveal (íris, corpo ciliar e coroide) quanto às estruturas adjacentes, como retina, nervo óptico e vítreo. Trata-se de uma doença de alta complexidade, que pode ser desencadeada pela presença de agentes infecciosos e/ou inflamatórios, existência de debilidade do sistema de defesa do organismo, ocorrência de traumas cirúrgicos e acidentais, uso de medicamentos ou por causas idiopáticas (AGARWAL *et al.*, 2020; BERTRAND *et al.*, 2019; HASSAN *et al.*, 2019).

Figura 3: Exemplo de olho apresentando sinais de uveíte.



Fonte: Academia americana de oftalmologia (AAO, 2022).

Essa doença é a terceira maior causa de cegueira no mundo, sendo responsável por cerca de 5 a 10% dos casos globais (TRIVEDI; KATELARIS, 2019).

Estima-se que nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa, a uveíte seja responsável por cerca de 5 a 20% dos casos de cegueira, enquanto em países em desenvolvimento, essa incidência aumenta para 25% (SMET *et al.*, 2011). Além disso, essa doença inflamatória é considerada como uma das principais causas de perda grave de visão. Estima-se que, dentre os pacientes com uveíte, de 20 a 70% experenciam uma grave redução da função visual (ROSENBAUM *et al.*, 2019).

É necessário ressaltar que a perda de visão associada à uveíte promove um grande impacto socioeconômico, uma vez que acomete, sobretudo, os indivíduos em idade economicamente ativa (ZHANG, Y. *et al.*, 2020). De acordo com o estudo realizado por Dunn (2015), a idade média dos pacientes é 37,2 anos e 70 a 90% dos pacientes apresentam de 20 a 60 anos de idade, sendo mais frequente em pacientes do sexo feminino. Em um estudo epidemiológico realizado no Brasil, constatou-se que a faixa etária (41,8%) dos pacientes diagnosticados com uveíte era entre 41 e 64 anos, sendo a média de $39,8 \pm 17,8$ anos e, assim como no estudo de Dunn (2015), verificou-se que a maioria dos pacientes era do sexo feminino (56,8%) (GONZALEZ FERNANDEZ *et al.*, 2016).

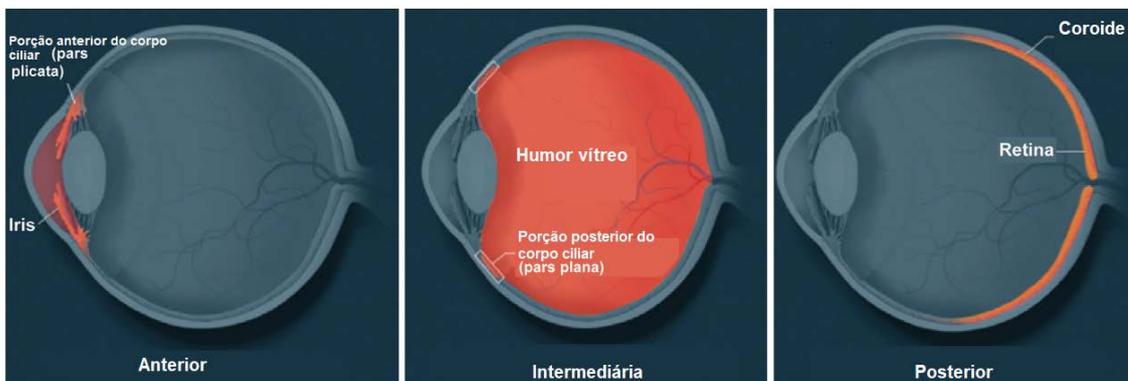
Existem vários esquemas para a classificação da uveíte. Em 2005, o grupo de padronização da nomenclatura das uveítes (*The Standardization of Uveitis Nomenclature working group- SUN*) desenvolveu a classificação que é a mais utilizada (quadro 1). Dessa forma, a uveíte pode ser classificada quanto ao local da inflamação/ anatomia (anterior, intermediária, posterior e panuveíte) (figura 4), de acordo com o início (súbito ou insidioso), curso clínico (aguda, recorrente ou crônica) e duração (limitada ou persistente) (JABS *et al.*, 2005).

Quadro 1- Classificação das uveítes de acordo com o grupo de padronização da nomenclatura de uveítes SUN

Categoria	Classificação e definição
Sítio primário da inflamação/ anatomia	-Anterior: câmara anterior. -Intermediária: vítreo. -Posterior: retina ou coroide. -Panuveíte: câmara anterior, vítreo, retina, coroide e/ou nervo óptico.
Início	-Súbito: início rápido dos sintomas. -Insidioso: início gradual dos sintomas.
Curso clínico	-Aguda: episódio único com início súbito e duração limitada. -Recorrente: episódios repetidos separados por períodos inativos sem tratamento \geq 3 meses de duração. -Crônica: uveíte persistente com recaída dentro de 3 meses após a interrupção do tratamento.
Duração	-Limitada: \leq 3 meses de duração. -Persistente: $>$ 3 meses de duração.

Fonte: Adaptado de JABS *et al.*, 2005; CASTRO, 2020.

Figura 4: Classificação da uveíte de acordo com o local da inflamação.



Fonte: Adaptado de ROSENBAUM *et al.*, 2019.

De acordo com Foster (2016), a forma mais prevalente é a uveíte anterior, seguida pela panuveíte, posterior e intermediária. Ressalta-se que, apesar da uveíte anterior ser a mais prevalente, a maioria dos pacientes que procuram especialistas em uveíte, apresenta a forma posterior (NGUYEN, Q. D. *et al.*, 2016).

Além disso, segundo o grupo internacional de estudos da uveíte (do inglês *International Uveitis Study Group*), a uveíte pode ser classificada de acordo com sua origem etiológica, podendo ser infecciosa, não infecciosa, mascarada ou idiopática. A uveíte infecciosa pode ser causada por vírus, bactérias, fungos, protozoários, dentre outros parasitas (FUKUNAGA *et al.*, 2020). Em geral, os agentes etiológicos envolvidos são *Herpes virus*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Cytomegalovirus*, *Varicela zoster virus* e outras infecções como sífilis, hanseníase e tularemia (PRETE *et al.*, 2016). Lin (2015) destaca que a uveíte infecciosa é mais comum em países em desenvolvimento, sendo responsável por cerca de 30 a 50% dos casos de uveíte.

Já em casos de uveíte não infecciosa, a origem pode ser tanto autoimune (reação a autoantígenos) quanto imunomediada (ativação anormal da resposta inflamatória inata) (PRETE *et al.*, 2016). A uveíte não infecciosa pode estar associada a doenças sistêmicas, tais como sarcoidose, espondiloartropatias soronegativas HLA-B27, doença de Behçet, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (NGUYEN, C. T. *et al.*, 2016; ROSENBAUM *et al.*, 2019).

A forma mascarada ocorre quando a uveíte mascara outras síndromes, ou seja, a inflamação intraocular é secundária a um distúrbio inicial ou as células e opacidades intraoculares são de origem não inflamatória (por exemplo, pigmento, sangue ou células malignas). É importante ressaltar que muitos distúrbios podem mascarar-se como uveíte, tais como linfoma intraocular, retinoblastoma, malignidades hematológicas, melanomas associados à retinopatias, descolamento ou degeneração da retina e trauma intraocular (ROTHOV *et al.*, 2001; TOUHAMI *et al.*, 2019).

Os casos idiopáticos são os mais frequentes, sendo responsáveis por 48-70% de todos os casos de uveíte (DUPLCHAIN *et al.*, 2022).

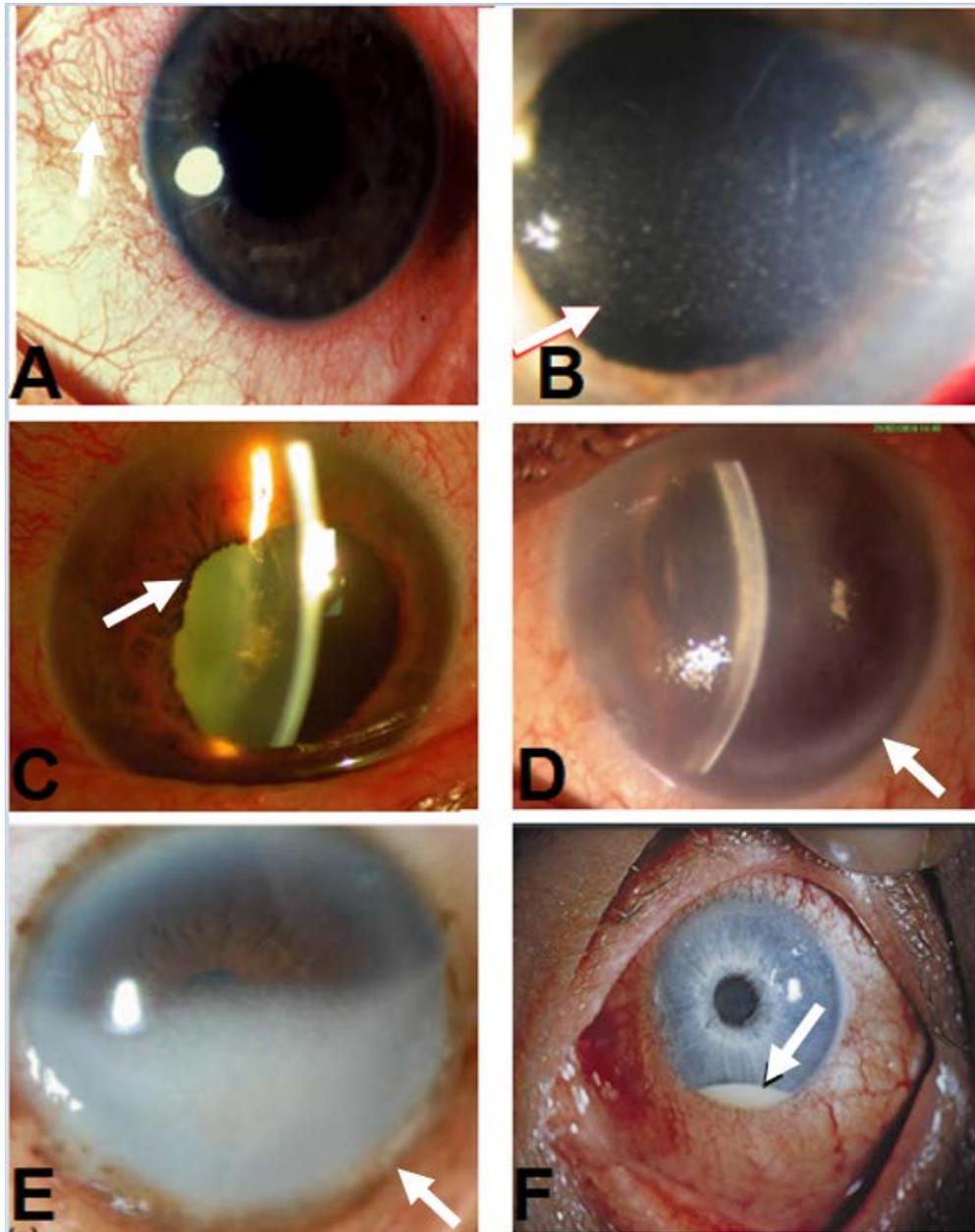
A uveíte pode ainda ser classificada de acordo com as principais características patológicas em uveíte granulomatosa ou não-granulomatosa, sendo a primeira caracterizada por visão turva, dor leve e uma pequena sensibilidade à luz,

enquanto a segunda apresenta início agudo, dor e sensibilidade intensa à luz e uma melhor taxa de recuperação, quando comparada à granulomatosa (MÉRIDA *et al.*, 2015).

Os sintomas das uveítes variam de acordo com a localização anatômica, tipo de uveíte, duração da doença, extensão da terapia e presença ou ausência de sequelas anteriores. Visão turva ou distorcida, fotofobia, dor vermelhidão, sensação de “moscas volantes”, diminuição da acuidade visual (retinite ou neurorretinite), fotopsia e pontos cegos são os sintomas mais comuns (DUNN, 2015).

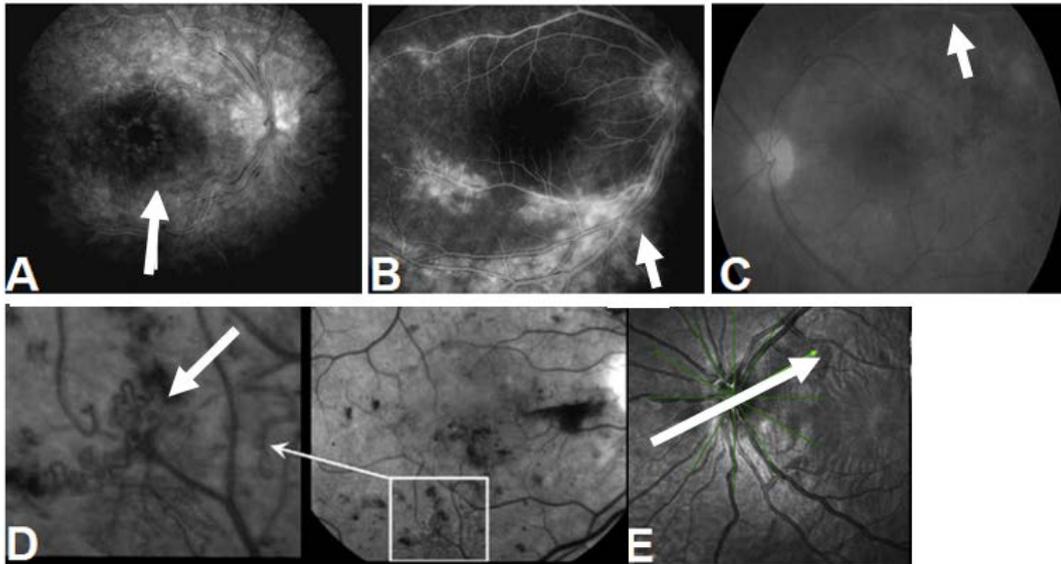
Outros sinais de uveíte incluem o rubor ciliar (figura 5a), afinamento corneano/escleral, precipitados ceráticos (depósitos inflamatórios na córnea posterior) (figura 5b), sinéquias anterior/posterior (aderências da íris à córnea ou cristalino) (figura 5c), edema corneano (figura 5d), ceratopatia em banda (depósitos de cálcio abaixo do epitélio da córnea) (figura 5e), hipópio (uma camada de células inflamatórias no ângulo inferior) (figura 5f), *haze* vítreo, bolas de neve (grandes coleções de células inflamatórias no vítreo), edema macular cistóide (figura 6a), vasculite retiniana (figura 6b), isquemia e/ou hemorragia retiniana (figura 6c), neovascularização retiniana/coroidal (figura 6d), descolamento de retina (figura 6e) e baixa pressão intraocular (DUNN, 2015, DUPLECHAIN *et al.*, 2022).

Figura 5: Sinais de uveíte indicados pela seta branca: (a) rubor ciliar; (b) precipitados ceráticos; (c) sinequia; (d) edema corneano; (e) ceratopatia em banda; (f) hipópio.



Fonte: Adaptado de DUNN, 2015; DUPLECHAIN *et al.*, 2022; JHANJI; RAPUANO; VAJPAYEE, 2011; MUÑOZ-FERNÁNDEZ; MARTIN-MOLA, 2006; SHARMA *et al.*, 2017.

Figura 6: Angiografias de fundo de olho apresentando os sinais de uveíte indicados pela seta branca: (a) edema macular cistóide; (b) vasculite retiniana; (c) isquemia e/ou hemorragia retiniana; (d) neovascularização retiniana; (e) descolamento de retina.



Fonte: Adaptado de AMER; NALCI; YALÇINDAĞ, 2017; DUPLECHAIN *et al.*, 2022; MUÑOZ-FERNÁNDEZ; MARTIN-MOLA, 2006; ADAMIS *et al.*, 2006.

Ressalta-se, ainda, que as complicações como catarata, neovascularização, edema macular, membrana epirretiniana (enrugamento da mácula), cicatrizes na coroide/retina e glaucoma estão associadas à perda da visão (DUNN, 2015, DUPLECHAIN *et al.*, 2022). Essas lesões podem acometer apenas um ou ambos olhos (PRETE *et al.*, 2016).

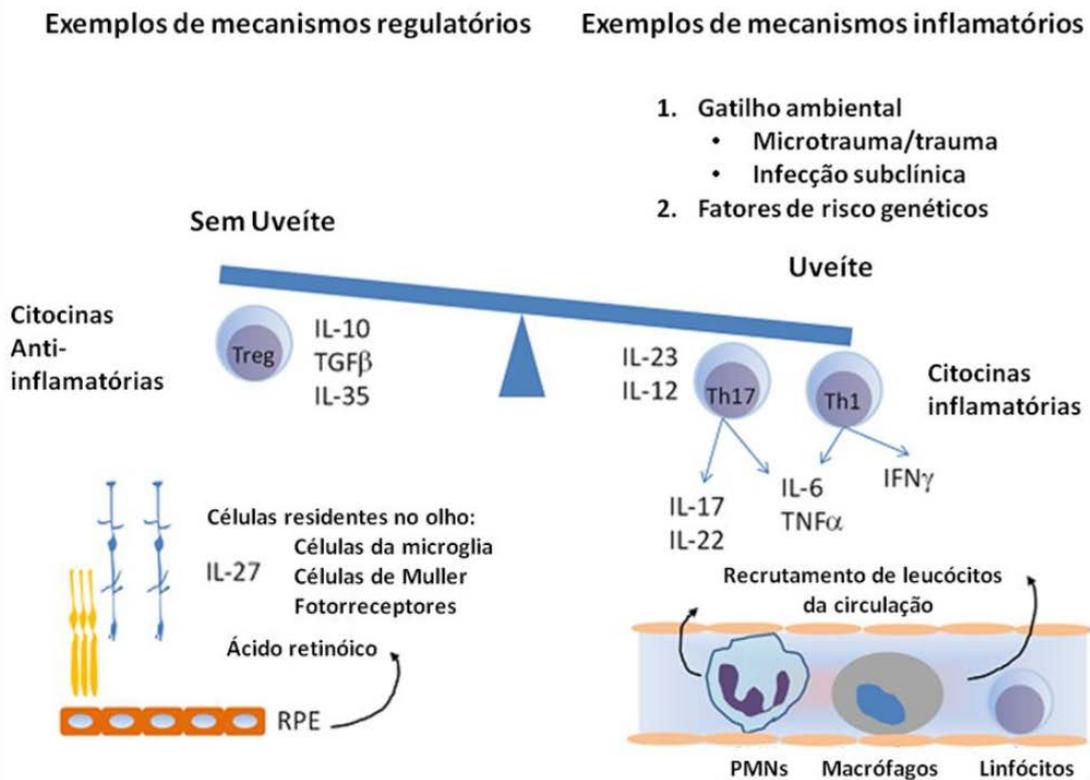
Dessa forma, a fim de se evitar danos cumulativos permanentes e, conseqüente perda de visão, o rápido prognóstico é essencial, visando reduzir a inflamação e atingir a remissão completa (PRETE *et al.*, 2016). Assim, para que haja uma abordagem efetiva para o tratamento da uveíte, a compreensão da patogênese da doença faz-se necessária.

2.2.1 Aspectos fisiopatológicos

O olho, assim como o cérebro, placenta e os testículos, é um dos locais de privilégio imunológico do organismo. Os mecanismos do privilégio imunológico

ocular incluem características anatômicas únicas de uma barreira sanguínea (BHR e BHA), ausência de drenagem linfática direta e mecanismos moleculares (figura 7).

Figura 7: Patogênese da uveíte



Fonte: Adaptado de LIN; SUHLER; ROSENBAUM, 2014 e PAIVA, 2019.

Um exemplo de um subgrupo de células imunes que mantêm o sistema imunológico sob controle são os linfócitos T reguladores (Treg), que produzem citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, o fator de crescimento transformador (TGF)- β e IL-35. Há, também, a IL-27, uma citocina anti-inflamatória que é produzida por células residentes na retina -células ganglionares e fotorreceptoras da retina. Além disso, a secreção de fatores imunossupressores (fator de transformação do crescimento TGF- β , Ligante Fas, fator de inibição de migração de macrófagos, MIF) pelas células presentes no olho, somados à baixa expressão de MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade do tipo II) nas células apresentadoras de antígenos, ajudam a inativar a resposta imune, ao reduzir a ativação e função de elementos da resposta imune inata, como as células NK (do inglês *natural killer*). Ainda ressalta-se que as células do RPE desempenhem um importante papel na indução de células

Treg, através da produção de ácido retinóico, na presença de TGF- β (LIN; SUHLER; ROSENBAUM, 2014; MÉRIDA *et al.*, 2015; TAYLOR, 2009).

No entanto, nem sempre, esse privilégio imunológico é suficiente. Portanto, se o mecanismo de proteção natural falhar ou for sobrecarregado, o olho torna-se susceptível aos distúrbios inflamatórios intraoculares, tais como a uveíte (MÉRIDA *et al.*, 2015).

Embora os aspectos fisiopatológicos da doença não tenham sido elucidados em sua totalidade, sugere-se que o desequilíbrio na regulação imunológica induzido por antígenos de retina – endógenos (distúrbios autoimunes) ou exógenos (vírus ou bactérias) – inicie um processo inflamatório descontrolado, que envolve a indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo: IL-2, IL-12, TNF- α , etc) e de fatores quimiotáticos, aumento das células apresentadoras de antígenos (APC-*antigen presenting cells*), células B e T, células endoteliais e ativação do sistema de complemento (LIN; SUHLER; ROSENBAUM, 2014; MÉRIDA *et al.*, 2015).

De modo geral, o processo inflamatório é mediado por macrófagos e células dendríticas residentes no tecido ocular, as quais ao realizarem a captura de antígenos promovem a ativação de linfócitos T, que podem diferenciar-se em Treg ou *Helper* (Th1, Th2, Th17). Evidencia-se que as células Th1 são cruciais para o desenvolvimento da uveíte (fase aguda), enquanto as Th17 desempenham um papel importante na fase crônica da doença. Além disso, faz-se necessário destacar que a migração de células Th1 e Th17 para o olho resulta também na quebra da BHR e, como consequência, os leucócitos presentes na circulação são recrutados, fornecendo mediadores finais para danos estruturais na retina, um passo fundamental no desenvolvimento da doença (LIN; SUHLER; ROSENBAUM, 2014).

Ressalta-se que essas reações imunológicas ocorrem tanto em casos de uveíte infecciosa quanto da não infecciosa, uma vez que a impossibilidade de eliminação completa do autoantígeno assemelha-se à situação de uma infecção persistente (CASTRO, 2020; MÉRIDA *et al.*, 2015; PAIVA, 2019; PRETE *et al.*, 2016).

Dessa forma, a abordagem terapêutica da uveíte pode ser direcionada aos mecanismos de sobreposição da progressão da doença, tais como a estimulação dos mecanismos reguladores ou inibição dos componentes inflamatórios, visando reduzir a latência, prevenir a recorrência e preservar a visão (CASTRO, 2020; LIN; SUHLER; ROSENBAUM, 2014).

2.2.2 Tratamento farmacológico da uveíte

O diagnóstico preciso e precoce é a chave para o sucesso terapêutico. O tratamento deve ser selecionado de acordo com a etiologia (infecciosa ou não) da uveíte, a localização anatômica da inflamação, lateralidade, resposta prévia, tolerância à terapia, doença ocular ou sistêmica concomitante, preferência do paciente, experiência do médico, custo e disponibilidade de medicamentos (DUNN, 2015).

No caso das uveítes não infecciosas, não existe um protocolo padrão para o tratamento, mas, de forma geral, a estratégia terapêutica utilizada inicia-se com o uso de corticosteroides tópicos e sistêmicos (de acordo com o tipo de uveíte) e cicloplégicos e midriáticos, quando necessário. O objetivo, nesta etapa, é controlar a inflamação/ fase aguda da uveíte de forma rápida e agressiva e os corticosteroides (exemplos: dexametasona, triancinolona, prednisolona e betametasona) são considerados agentes terapêuticos adequados para uso a curto prazo. Esses fármacos atuam por múltiplos mecanismos, que incluem a inibição da vasodilatação, redução da permeabilidade vascular, diminuição da migração de leucócitos, redução dos níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e supressão da proliferação e da ação de células T e da produção de citocinas (GALLEGO-PINAZO *et al.*, 2013; ROSENBAUM *et al.*, 2019; SMET *et al.*, 2011)

Assim, após o controle da fase aguda, o desafio é o manejo da doença a longo prazo. Dessa forma, o objetivo nesta etapa é manter a remissão da doença ao mesmo tempo em que se visa minimizar os eventos adversos dos agentes terapêuticos de escolha. Os imunossuppressores antimetabólitos (exemplos: metotrexato, micofenolato de mofetila e azatioprina) são os agentes de segunda linha. Além disso, alguns estudos também recomendam o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), em indicações selecionadas, nesta etapa (HASSAN *et al.*, 2019; ORMAECHEA *et al.*, 2019).

A terceira linha de tratamento implica o emprego dos imunossuppressores inibidores da calcineurina (exemplos: ciclosporina, tacrolimus). Abordagens não terapêuticas, como procedimento cirúrgico (criopexia periférica retiniana) ou fotocoagulação a laser podem ser indicadas nessa etapa para pacientes com uveíte intermediária ou *pars planite*. Na etapa seguinte, introduzem-se os imunossuppressores por via sistêmica (em alguns casos, o tratamento pode ser

iniciado nesta etapa), reduzindo-se, de forma gradual, a dose dos corticosteroides (AIRODY *et al.*, 2016; CASTRO, 2020).

Na sequência, são introduzidos os agentes biológicos (exemplos: adalimumabe, infliximabe, anakinra, tocilizumabe, bevacizumabe), porém, em muitos casos, eles têm sido a terapia de escolha após a falha com antimetabólitos. Os agentes alquilantes (exemplos: ciclofosfamida, clorambucil) correspondem à última linha de escolha, devido ao uso limitado na prática clínica, em decorrência de eventos adversos graves. Uma alternativa não farmacológica é a vitrectomia terapêutica (GALLEGO-PINAZO *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2019).

É importante advertir que, ao iniciar a terapia com corticosteroides ou imunossupressores em pacientes com inflamação ocular, é necessário que as causas infecciosas ou neoplásicas sejam descartadas. O uso indiscriminado de imunossupressão tópica ou sistêmica pode ter efeito deletério no resultado do tratamento em casos infecciosos, podendo também mascarar os sinais de uma malignidade intraocular, até então, não diagnosticada, levando a um atraso no diagnóstico e no manejo correto. Nos casos de uveíte infecciosas, o tratamento deve ser baseado na eliminação do patógeno (bactéria, vírus, fungo, parasita), por meio do uso de antimicrobianos e deve-se ter bastante cautela com o uso de corticosteroides ou imunossupressores (AIRODY *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2019).

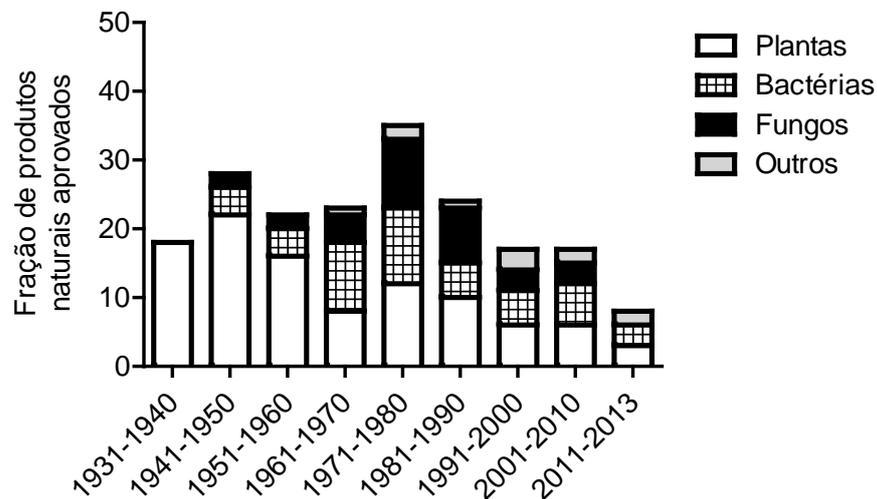
Ainda, ressalta-se que embora os corticosteroides sejam a terapia base para o tratamento das uveítes, os eventos adversos graves (síndrome de Cushing, hiperglicemia, hipertensão, úlcera gástrica e osteoporose, além do risco de catarata, glaucoma, coriorretinopatia e ceratites infecciosas) relacionados ao uso desses medicamentos, estimulam a investigação de terapias alternativas, que permitam aos pacientes menor dependência aos corticosteroides. Além disso, é significativa a parcela de pacientes que requer, em um determinado momento do tratamento, a troca terapêutica para uma opção poupadora de corticosteroides ou tratamentos locais. Assim como ainda há uma necessidade significativa e não atendida de novas opções terapêuticas para uveítes, vários ensaios pré-clínicos e clínicos com diferentes alternativas estão em andamento (AIRODY *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2019; ROSENBAUM *et al.*, 2019). Dessa forma, o futuro do tratamento de uveítes é promissor, considerando que existem vários agentes que podem revolucionar o tratamento (VALENZUELA *et al.*, 2020).

2.3 Substâncias naturais na oftalmologia

Novas condutas farmacoterapêuticas para o tratamento da uveíte têm sido alvo de estudos constantes. Diversas fontes de produtos naturais, tais como plantas, bactérias, fungos, vertebrados, invertebrados e organismos marinhos têm sido utilizados em pesquisas para a obtenção de novos fármacos. Dentre as diversas fontes naturais que podem ser exploradas na busca de agentes terapêuticos, existe um enorme interesse nas plantas, decorrente do elevado número de substâncias derivadas de plantas que deram origem a medicamentos (CHENG *et al.*, 2021, SOUSA, 2016).

De acordo com Patridge e colaboradores (2016), até o final de 2013, o órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) havia aprovado cerca de 547 produtos naturais e/ou seus derivados, sendo cerca de 5% destes produtos provenientes de plantas. A figura a seguir (figura 8) demonstra a fração de produtos naturais aprovados, desde 1930.

Figura 8: Fração de produtos naturais aprovados, de acordo com a fonte, no período de 1930 a 2013.



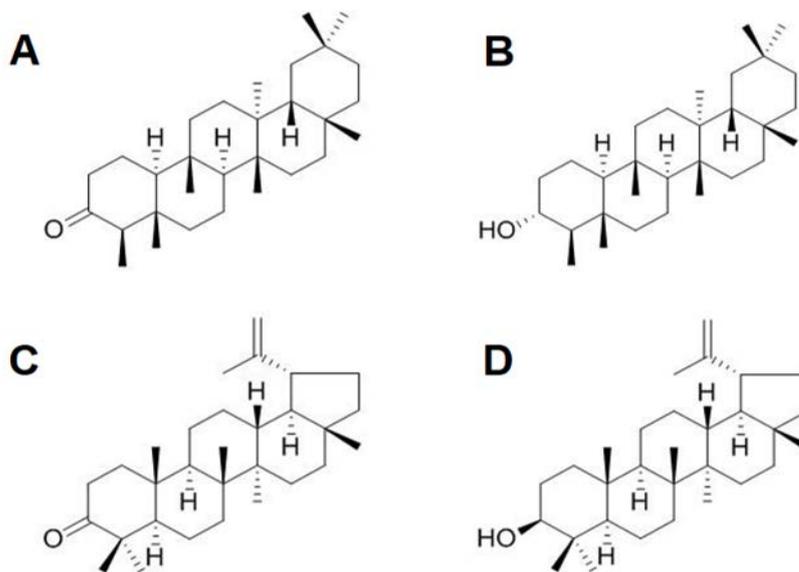
Fonte: Adaptado de PATRIDGE *et al.*, 2016.

No ramo da oftalmologia, pesquisas têm sido conduzidas no intuito de avaliar a aplicabilidade de substâncias provenientes de plantas medicinais nos segmentos anterior e/ou posterior do olho (ALVARADO *et al.*, 2015; CHENG *et al.*, 2019, 2021; MARTÍNEZ-SOLÍS *et al.*, 2019; OH *et al.*, 2015; PAIVA; VASCONCELOS-SANTOS;

et al., 2021; PESCOSOLIDO *et al.*, 2014; SILVA, F. R. *et al.*, 2020; TOLEDO *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2020). Alguns pesquisadores têm empregado os triterpenos pentacíclicos como substâncias ativas e, dentre eles, podem-se destacar os ácidos betulínico, corosólico, oleanólico e ursólico.

Uma rica fonte de terpenos (TPs), em especial os pentacíclicos, são as espécies da família Celastraceae (SOUSA, G. F. D. *et al.*, 2017). As plantas da família Celastraceae compreendem cerca de 1260 espécies, encontradas, sobretudo, nas regiões tropicais (DUARTE, 2000) e, portanto, distribuídas no território brasileiro, sendo encontradas tanto na vegetação de restinga, quanto no interior da floresta (SOUSA, 2016). Em relação ao estado de Minas Gerais, um dos principais gêneros encontrados é o *Maytenus* e, dentre os constituintes isolados dessas plantas, destacam-se os TPs: friedelina (FA), friedelinol (FL), lupenona (LA) e lupeol (LL) (figura 9).

Figura 9: Estrutura química dos triterpenos (A) FA; (B) FL; (C) LA; (D) LL.



Na literatura, há relatos de vários tipos de atividade biológica para essas substâncias. E nesse contexto, têm sido atribuídas atividades anti-inflamatória (ANTONISAMY; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011), antiproliferativa e proapoptótica (MARTUCCIELLO *et al.*, 2010) à FA. Para o FL foram encontrados estudos referentes à ação citotóxica contra linhagens de células tumorais (KUETE *et al.*, 2017; SOUSA, G. F. *et al.*, 2014).

Para a LA, foram atribuídas atividades antidiabéticas e anti-inflamatórias (XU *et al.*, 2018). Já o LL, um dos terpenos mais estudados, apresenta um amplo espectro de atividades biológicas. O estudo de Gallo e Sarachine (2009) fez um levantamento acerca das principais atividades biológicas atribuídas a esse triterpenoide e foram relatadas ações antidiabética, anti-inflamatória e antiprotozoária. Além disso, há relatos relacionados à sua ação sobre o sistema nervoso central – potencial para atenuar a neurodegeneração e neuroinflamação (BADSHAH *et al.*, 2016; MARTINI *et al.*, 2007), atividade cicatrizante (MALINOWSKA *et al.*, 2019) e antiangiogênica (SOARES *et al.*, 2017). Ressalta-se ainda que o estudo de Asha e colaboradores (2016) demonstrou que a administração oral de LL é capaz de atenuar o desenvolvimento da catarata em ratos.

Aliado a esse cenário promissor, destaca-se que não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem a toxicidade ocular dos TPs (FA, FL, LA e LL), bem como sua aplicabilidade em modelos *in vivo* de doenças oculares inflamatórias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiangiogênica e a segurança da administração intravítrea dos triterpenos friedelina, friedelinol, lupenona e lupeol, bem como investigar a eficácia terapêutica do lupeol e da lupenona como agentes anti-inflamatórios, por meio de ensaio *in vitro* e em modelo murino de uveíte experimental induzida pelo bacilo de Calmette-Guérin - BCG.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos triterpenos em uma linhagem celular isolada a partir do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19).
- ✓ Verificar a atividade antiangiogênica dos triterpenos em modelo de membrana corioalantoica do embrião de galinha.
- ✓ Analisar os efeitos a retina causados pela administração intravítrea de diferentes doses (100 e 500 $\mu\text{mol/L}$) dos triterpenos em olhos de ratos por meio da análise das alterações clínicas e avaliações eletrofisiológicas e histopatológicas.
- ✓ Investigar a eficácia anti-inflamatória *in vitro* da lupenona e do lupeol na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ em células ARPE-19 após estímulo com LPS.
- ✓ Avaliar a eficácia dos triterpenos lupenona e lupeol, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, em um modelo de uveíte experimental induzido por BCG (Bacilo Calmette-Guérin) em ratos.

**CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA,
SEGURANÇA E TOXICIDADE DA APLICAÇÃO OCULAR DOS
TRITERPENOS**

1 MATERIAIS

1.1 TPs isolados de plantas do gênero *Maytenus*

Os triterpenos pentacíclicos: FA (massa molar 426,72 g/mol), FL (massa molar 428,74 g/mol), LA (massa molar 424,71 g/mol) e LL (massa molar 426,79 g/mol) foram cedidos pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Plantas Medicinais do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil. Esses TPs foram isolados a partir de plantas do gênero *Maytenus*, cujo acesso está registrado no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético / Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (CGen / SisGen) sob os números AEED846 e A0B3BAC. Esses triterpenos isolados foram caracterizados por meio de análises espectrais (infravermelho e RMN) e determinação do ponto de fusão (MAGALHÃES *et al.*, 2011; SOUSA, G. F. *et al.*, 2014)

1.2 Reagentes e outros materiais

a) Para a avaliação da viabilidade celular *in vitro*: Linhagem celular ARPE-19 (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). Meio de cultura DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12*), soro fetal bovino (SFB), e PSA 100 x (penicilina - estreptomicina -anfotericina B) da Gibco, EUA. Tripsina-EDTA, sulforrodamina B (SRB), tris base e ácido tricloroacético (TCA) da Sigma-Aldrich, EUA. Dimetilsulfóxido (DMSO) da Synth, Brasil.

b) Para avaliação da atividade antiangiogênica em membrana corioalantóica de ovos de galinha: Ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross, Rivelli, Mateus Leme, Brasil. Bevacizumabe (Avastin®, Roche, Brasil). Fosfato de sódio bibásico anidro, fosfato de potássio monobásico anidro, cloreto de potássio e cloreto de sódio da Synth, Brasil. Água ultrapurificada – Milli Q® plus, Merck Millipore, EUA.

c) Para toxicidade *in vivo* em ratos: Cloridrato de cetamina (Dopalen®) e cloridrato de xilazina (Anasedan®) da Ceva, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% e

cloridrato de fenilefrina 0,1% (Anestésico®, Allergan, EUA); tropicamida 10 mg/mL (Mydriacyl®, Alcon, EUA). Agulhas BD ultrafine II (0,3 mm, Brasil).

1.3 Equipamentos e acessórios

Sistema de purificação de água Milli-Q® (Merck Millipore, EUA), balança analítica (Sartorius, Alemanha), agitador vórtex (IKA Werke, Alemanha), leitor de microplacas Benchmark Plus (Bio-Rad, Brasil), microscópio óptico Axio Imager M2 (Zeiss, Alemanha), incubadora automática digital (Premium Ecologica®, Brasil), estereomicroscópio Motic® equipado com câmera Motic Cam® (Motic, EUA), eletrorretinograma (ERG) Espion E² Colordome™ (Diagnosys LLC, EUA), eletrodo unipolar do tipo lente sobre a córnea (eletrodos LKC ERG Jet – R225, Fabrinal SA, Suíça), eletrodos de referência do tipo agulha (ERG Jet, Fabrinal SA, Suíça), oftalmoscópio binocular indireto (Welch Allin, Brasil).

1.4 Animais

Trinta e dois ratos adultos machos da espécie Wistar, com aproximadamente 200 g, foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Durante o período de estudo, os animais foram mantidos no Biotério, dentro de caixas com grades contendo três animais e em estante ventilada, sob condições controladas de temperatura (27 ± 1 °C) e luminosidade (ciclo claro e escuro de 12 horas, com luz iniciando às 7 horas) e com livre acesso à ração e água.

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e Visão da ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) e com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), o qual aprovou a realização do projeto sob o protocolo de número 300/2018 (Anexo 1).

2 MÉTODOS

2.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos TPs sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)

2.1.1 Preparo das soluções estoques a 5000 µmol/L

Foram preparadas quatro soluções estoques: FA 5000 µmol/L, FL 5000 µmol/L, LA 5000 µmol/L e LL 5000 µmol/L. Como os TPs apresentam massas molares semelhantes, adotou-se o mesmo procedimento para o preparo das soluções-estoque de cada um deles.

Foram pesados $2,13 \pm 0,03$ mg do TP em um microtubo. Adicionou-se 0,1 mL de DMSO e agitou-se por 1 minuto em agitador orbital, obtendo-se uma solução de concentração de 50000 µmol/L. Em seguida, em um criotubo contendo 180 µL de meio DMEM-F12, transferiu-se uma alíquota de 20 µL da solução a 50000 µmol/L e homogeneizou-se. A concentração final foi 5000 µmol/L.

2.1.2 Ensaio Colorimétrico da Sulforrodamina B

Avaliou-se a citotoxicidade promovida pelos TPs em uma linhagem celular isolada a partir do epitélio pigmentado da retina humana (ARPE-19) por meio do ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB), descrito por Skehan (1990). O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia aplicada à Biologia Molecular, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, UFMG.

Para a realização desse ensaio, células da linhagem ARPE-19 foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 1% PSA e mantidas em atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

Inoculou-se 100 µL/poço da suspensão celular (10^5 células/mL) em placas 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, foram adicionados, os tratamentos com concentrações crescentes dos TPs (5 – 640 µmol/L), preparados a partir da solução estoque a 5000 µmol/L (descrito em 2.1.1). Em seguida, as células foram incubadas por 48 horas. Ao final desse tempo, fixaram-se as células com 100 µL de TCA a 10% (v/v) e incubou-as por 1 hora a 4

°C. As placas foram lavadas e mantidas à temperatura ambiente até secagem completa. A coloração foi realizada por meio da adição de 100 µL de SRB a 0,057% (p/v) dissolvido em 1% de ácido acético, durante um período de 30 minutos. As placas foram lavadas com uma solução de ácido acético 1% e secas, novamente, em temperatura ambiente. Feita a secagem, as células foram observadas por microscopia óptica, no intuito de avaliar alterações morfológicas. Em seguida, o corante ligado às proteínas foi solubilizado com 100 µL de tris base (10 µmol/L, pH 10,5) e a absorbância medida em leitor de microplacas a 510 nm. Foram realizados três estudos independentes, sendo cada experimento realizado com três replicatas. O desenho das placas encontra-se representado a seguir (figura 10).

Figura 10: Esquema da placa utilizada no estudo de citotoxicidade, demonstrando os poços: controle, tris-base e as concentrações dos TPs (FA, FL, LA, LL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		FA 640	FA 320	FA 160	FA 80	FA 40	FA 20	FA 10	FA 5			
C		FA 640	FA 320	FA 160	FA 80	FA 40	FA 20	FA 10	FA 5			
D		FA 640	FA 320	FA 160	FA 80	FA 40	FA 20	FA 10	FA 5			
E												
F		FL 640	FL 320	FL 160	FL 80	FL 40	FL 20	FL 10	FL 5			
G		FL 640	FL 320	FL 160	FL 80	FL 40	FL 20	FL 10	FL 5			
H		FL 640	FL 320	FL 160	FL 80	FL 40	FL 20	FL 10	FL 5			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		LA 640	LA 320	LA 160	LA 80	LA 40	LA 20	LA 10	LA 5			
C		LA 640	LA 320	LA 160	LA 80	LA 40	LA 20	LA 10	LA 5			
D		LA 640	LA 320	LA 160	LA 80	LA 40	LA 20	LA 10	LA 5			
E												
F		LL 640	LL 320	LL 160	LL 80	LL 40	LL 20	LL 10	LL 5			
G		LL 640	LL 320	LL 160	LL 80	LL 40	LL 20	LL 10	LL 5			
H		LL 640	LL 320	LL 160	LL 80	LL 40	LL 20	LL 10	LL 5			

Legenda:

	Controle de células (ARPE-19)		Tris-base		Controle positivo da morte (PBS 1x)
FA	Poços com células e soluções de FA (umol/L)	LA	Poços com células e soluções de LA (umol/L)	LL	Poços com células e soluções de FL (umol/L)
FL	Poços com células e soluções de FL (umol/L)				

Fonte: do autor.

A porcentagem de células viáveis, após 48 horas, para as soluções dos TPs, foi determinada de acordo com a Equação 1.

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

Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão (DP). 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% (IC₅₀), a partir da curva dose-resposta, que foi obtida pelo programa GraphPad Prism®5.

2.2 Avaliação da atividade antiangiogênica dos TPs em membrana corioalantoica de embrião de galinha

2.2.1 Preparo das suspensões dos TPs

Foram preparadas quatro suspensões estoques: FA 1000 $\mu\text{mol/L}$, FL 1000 $\mu\text{mol/L}$, LA 1000 $\mu\text{mol/L}$ e LL 1000 $\mu\text{mol/L}$.

Pesaram-se $5,00 \pm 0,05$ mg de cada TP, foram adicionados 0,03 mL de DMSO e agitou-se por 1 minuto em agitador orbital. Em seguida, foram adicionados 10,0 mL de PBS estéril pH 7,4, obtendo-se uma suspensão de concentração de 1000 $\mu\text{mol/L}$. Essa suspensão foi deixada no ultrassom por 30 minutos. A diluição para o preparo das suspensões encontra-se descrita no quadro 2.

Quadro 2: Diluições de TPs para realização dos ensaios em membrana corioalantoica de embrião de galinha.

Concentração ($\mu\text{mol/L}$)	Alíquota da solução estoque (mL)	Volume final (mL)
50	0,25	5,00
100	0,50	5,00
500	2,50	5,00
1000	5,00	5,00

2.2.2 Ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha

Avaliou-se a atividade antiangiogênica dos TPs por meio do ensaio da membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM- *chorioalantoic membrane assay*), descrito por Auerbach e colaboradores (1974).

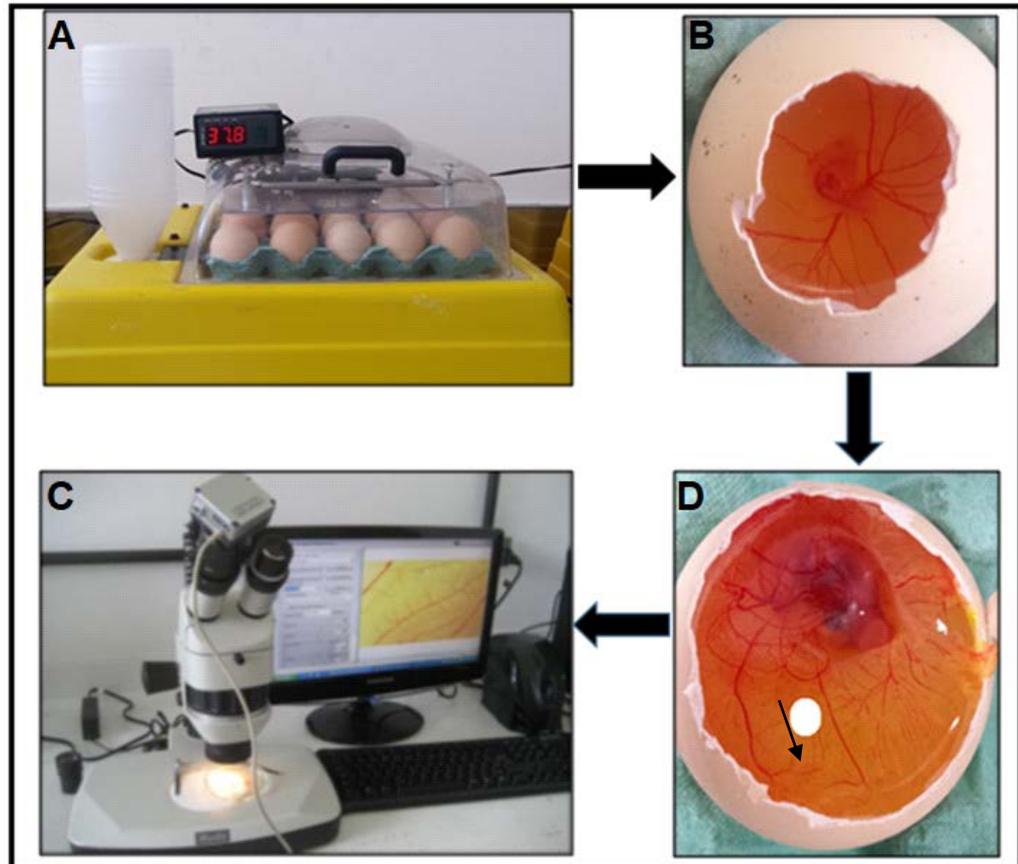
Para a realização da CAM, ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus* e da linhagem Ross foram incubados à temperatura de 37 °C e 60% de umidade relativa do ar, na posição horizontal, utilizando uma incubadora automática digital. No 3º dia do desenvolvimento embrionário foi feita uma abertura circular de cerca de 1,0 cm de diâmetro na região da câmara de ar da casca dos ovos, descartando-se os ovos inviáveis (não embrionados). A membrana interna da casca foi removida, a fim de expor a membrana corioalantoica e os ovos foram selados com fita adesiva transparente. Com auxílio de um suporte de papel, os ovos foram acondicionados na incubadora.

No 5º dia de desenvolvimento, foram colocados sobre a membrana corioalantoica, discos de celulose de tamanho padronizado, em que foram aplicados 20 µL das amostras. Os seguintes grupos de tratamento foram estabelecidos (n=8):

- ✓ controle positivo: solução de bevacizumabe 1 µmol/L;
- ✓ controle negativo: solução de PBS pH 7,4 + DMSO 0,3 %;
- ✓ suspensões de FA (50, 100, 500 e 1000 µmol/L) (preparo descrito no item 2.2.2).
- ✓ suspensões de FL (50, 100, 500 e 1000 µmol/L) (preparo descrito no item 2.2.2).
- ✓ suspensões de LA (50, 100, 500 e 1000 µmol/L) (preparo descrito no item 2.2.2).
- ✓ suspensões de LL (50, 100, 500 e 1000 µmol/L) (preparo descrito no item 2.2.2).

Após 24 horas, ou seja, no 6º dia de incubação, os grupos foram monitorados e as amostras reaplicadas. No 7º dia de incubação realizou-se a extração das membranas, após prévia fixação com solução de formaldeído a 10% por 10 minutos. As membranas foram fotografadas com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio, sendo as imagens obtidas pelo *software* Motic Images Plus 2.0, com um aumento padronizado de 20x. As imagens sequenciais ilustrativas do ensaio de angiogênese são mostradas na figura 11.

Figura 11: Imagens sequenciais do procedimento do ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (A) incubação dos ovos; (B) abertura circular na região da casca; (C) aplicação da amostra sob o disco de celulose (indicado pela seta); (D) fotografias das membranas.



Fonte: TOLEDO, 2018.

As imagens foram convertidas em escala de cinza com o auxílio do software ImageJ (versão 1.50i). Em seguida, utilizou-se o software AngioTool (versão 6.0) para quantificar as alterações na densidade vascular, comprimento dos vasos e número total de junções. O controle negativo foi fixado em 100% e os resultados expressos como média percentual \pm DP. Os dados foram avaliados por meio de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, utilizando-se o programa GraphPad Prism®5 e adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

2.3 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas dos TPs em modelo *in vivo*

2.3.1 Preparo das suspensões dos TPs

Oito suspensões individuais dos TPs foram preparadas, no intuito de atingir uma concentração vítrea de 500 $\mu\text{mol/L}$ e 100 $\mu\text{mol/L}$. Assim, considerando-se que o vítreo de ratos apresenta um volume de aproximadamente 56 μL (AKAGAWA *et al.*, 2018) e que o volume da injeção intravítrea é 5 μL , foram preparadas as seguintes suspensões: FA 6,10 mmol/L, FL 6,10 mmol/L, LA 6,10 mmol/L, LL 6,10 mmol/L, FA 1,22 mmol/L, FL 1,22 mmol/L, LA 1,22 mmol/L e LL 1,22 mmol/L.

Para cada TP, pesaram-se $5,20 \pm 0,05$ mg, foram adicionados 0,03 mL de DMSO e agitou-se por 1 minuto em agitador orbital. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de PBS estéril pH 7,4, obtendo-se uma suspensão de concentração de 5,60 mmol/L. As suspensões foram deixadas no ultrassom por 30 minutos. Em seguida, foram transferidos 0,4 mL de cada suspensão para um microtubo contendo 1,6 mL de PBS estéril pH 7,4, obtendo-se no final as suspensões de TPs a 1,12 mmol/L.

2.3.2 Administração intravítrea

A avaliação da toxicidade sobre a retina das injeções intravítreas dos TPs foi realizada em olhos de ratos adultos machos da espécie Wistar. Os animais foram divididos em oito grupos contendo quatro animais cada, sendo que, em cada grupo, o olho direito (OD) recebeu por via intravítrea 5,0 μL do tratamento enquanto o olho esquerdo (OE) foi utilizado como controle.

Para a realização das injeções intravítreas, os animais foram anestesiados via injeção intraperitoneal (10 mg/kg de xilasina e 90 mg/Kg de cetamina) e os olhos anestesiados com colírio de cloreto de proximetacaína 0,5%. As injeções foram realizadas com uma seringa de insulina e agulha 30 G, a 2 mm do limbo, com visibilização da agulha na cavidade vítrea e, a fim de evitar vazamentos, esperou-se cerca de 30 segundos para remover a agulha. Fez-se uma avaliação do fundo do olho dos animais por oftalmoscopia binocular indireta, a fim de detectar possíveis alterações oculares que pudessem comprometer os resultados da pesquisa, como por exemplo, hemorragias e/ou descolamento de retina.

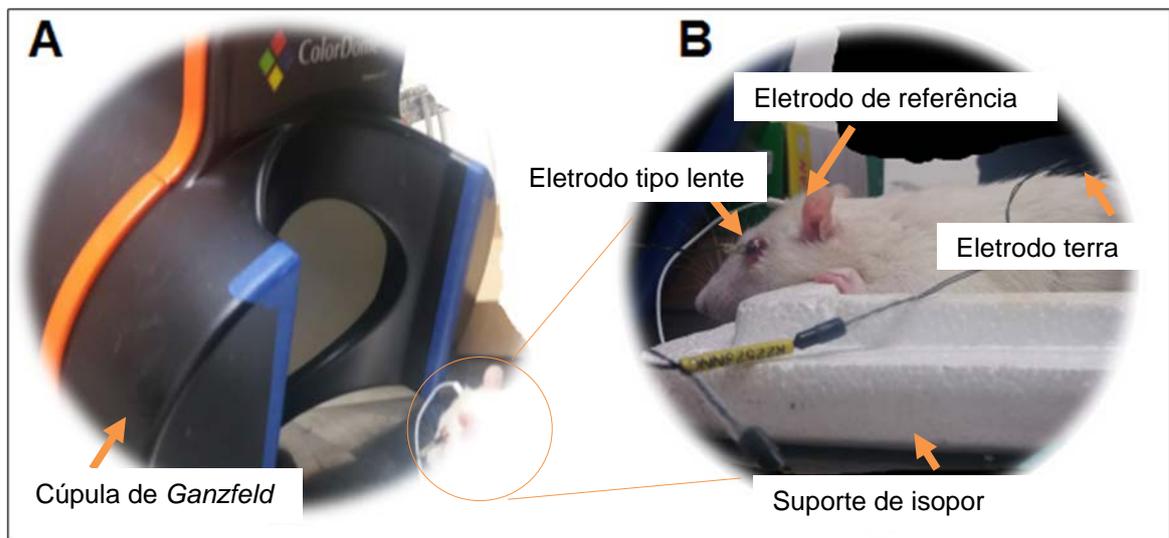
A segurança da administração intravítrea dos TPs foi avaliada por meio de ensaios eletrorretinográfico e histológico dos olhos dos animais.

2.3.3 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma

O estudo funcional da retina por eletrorretinograma (ERG) foi realizado antes das injeções intravítreas, 7 e 15 dias após as injeções. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pela ISCEV (*International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) (ROBSON *et al.*, 2018).

Para a realização do ERG, os animais foram adaptados ao escuro *overnight*, anestesiados via injeção intraperitoneal de 10 mg/Kg de xilasina e 90 mg/Kg de cetamina, as pupilas foram dilatadas com colírio de tropicamida 1% e os olhos anestesiados com colírio de cloreto de proximetacaína 0,5%. Os animais foram posicionados sob um suporte de isopor adaptado à cúpula de *Ganzfeld* (que, em alemão, significa campo total) (figura 12 A) e cobertos com uma manta para a manutenção da temperatura corporal.

Figura 12: Exame de eletrorretinografia. (A) Cúpula de Ganzfeld. (B) Posicionamento do animal, dos eletrodos e da lente.



Fonte: Adaptado de TOLEDO, 2018.

As respostas ERG foram adquiridas, ao mesmo tempo, nos dois olhos, utilizando eletrodo unipolar do tipo lente sobre a córnea; eletrodos de referência do tipo agulha foram fixados subcutâneo na pele, na região frontal, acima dos olhos e o eletrodo-terra foi fixado subcutâneo no dorso do animal (figura 12 B) (MCCULLOCH *et al.*, 2015). Os olhos foram estimulados usando um estimulador de LED *Ganzfeld* (ColorDome™).

Para exames do tipo escotópico, flashes de luz branca (6500 K) com duração de 4 ms foram conduzidos em 11 *steps*, sendo dois, os principais: a intensidade luminosa de 0,01 cd.s.m⁻² para avaliação da função dos bastonetes e a intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m⁻² 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⁻²) por 10 minutos. Em seguida, foi utilizada a intensidade de 3,0 cd.s.m⁻² com duração de 4 ms, seguida de flashes luminosos repetidos na frequência de 30 Hz (*flicker*) 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 E³* (Diagnosys LLC).

As análises foram realizadas a partir dos componentes das ondas a e b do ERG perante as diferentes intensidades e frequências luminosas. Os resultados foram expressos como a média \pm DP. Os dados foram avaliados por meio de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$, utilizando o programa GraphPad Prism®5.

2.3.4 Avaliação histológica

Após a realização do último exame ERG, todos os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésicos e os olhos preparados para análise histológica. Os olhos foram enucleados e fixados em solução de Davidson (álcool 95%, formaldeído, ácido acético glacial e água ultrapurificada) por 24 horas. Após este tempo, foram transferidos para uma solução de álcool 70% e seccionados próximos ao nervo óptico. As amostras foram desidratadas com soluções de etanol em concentrações crescentes (70 - 100%), clarificadas em xilol por 24 horas e depois incorporadas em parafina para obtenção dos blocos. Para a montagem das lâminas, os blocos foram cortados em micrótomo (5 μ m) e o cortes foram corados

com hematoxilina-eosina (HE) (PAIVA *et al.*, 2019). O processamento e a confecção das lâminas foram realizados pela empresa Célula Vet.

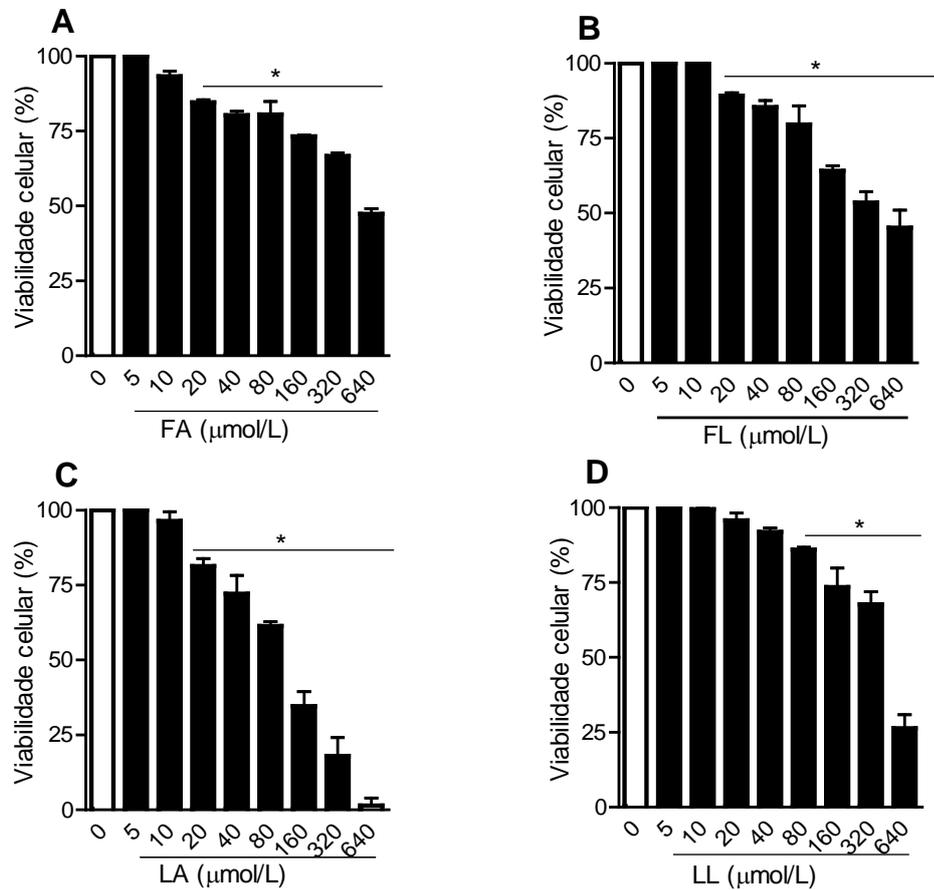
Por microscopia óptica, as lâminas foram avaliadas qualitativamente quanto à integridade da retina, levando-se em consideração parâmetros como a espessura e organização de cada camada, presença de sinais de irritação ou inflamação (edema e/ou neovascularização) ou qualquer outra anormalidade. As retinas dos olhos que receberam injeções intravítreas dos TPs foram comparadas às dos olhos controles.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos TPs sobre células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)

O ensaio de citotoxicidade com o emprego da SRB baseia-se na habilidade desse corante ligar-se aos aminoácidos básicos presentes nas proteínas das células viáveis fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA). Dessa maneira, quanto maior a quantidade de SRB ligada às proteínas, menor será a citotoxicidade dos TPs em teste. A figura 13 apresenta a porcentagem de células viáveis para concentrações crescentes de cada um dos TPs, em relação ao grupo controle (tratado com meio de cultura), após 48 horas.

Figura 13: Viabilidade de células da linhagem ARPE-19, após 48h, mediante a presença de concentrações crescentes (5-640 $\mu\text{mol/L}$) dos TPs (A) FA; (B) FL; (C) LA; (D) LL.

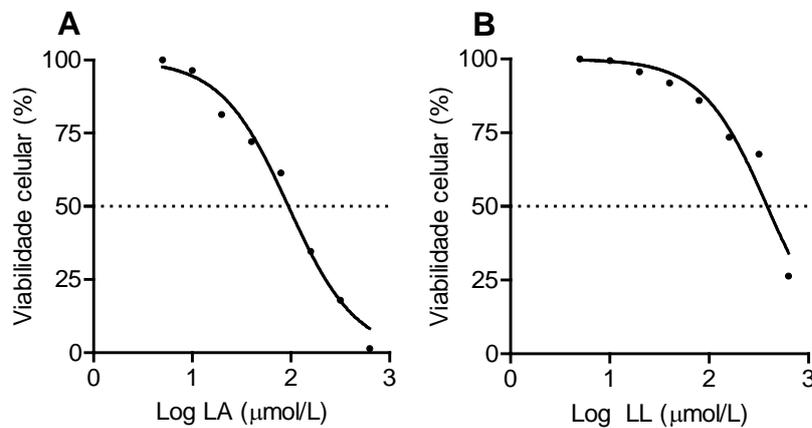


*Diferença significativa do grupo controle. Valor-p <0.05.

Foram observadas diferenças significativas entre o controle e as células tratadas com concentrações de FA e FL na faixa de 20 a 640 $\mu\text{mol/L}$. Apesar da diferença estatística calculada, notou-se que os grupos que receberam concentrações de até 80 $\mu\text{mol/L}$, apresentaram uma viabilidade celular superior a 80%. Além disso, mesmo nos grupos que receberam a concentração máxima, não foi possível observar uma inibição total do crescimento celular, o que inviabilizou a elaboração da curva dose-resposta e o cálculo da IC_{50} do FA e FL sob ARPE-19. A partir dos resultados apresentados, é possível estimar que a IC_{50} para ambas as substâncias seja superior a 320 $\mu\text{mol/L}$.

Em relação às células tratadas com concentrações crescentes de LA, verificou-se uma diferença estatística entre o controle e os grupos que receberam concentrações superiores a 20 $\mu\text{mol/L}$. Entretanto, nos grupos tratados com concentrações superiores a 160 $\mu\text{mol/L}$, notou-se uma inibição do crescimento celular superior a 50%, o que possibilitou a elaboração da curva dose-resposta (figura 14-A), obtendo-se $y=100/1+10^{(1.976-x) \cdot (-1,268)}$; $r^2= 0,9850$ como equação da reta. A IC_{50} calculada foi 94,54 $\mu\text{mol/L}$, após 48 horas de tratamento.

Figura 14: Curva da viabilidade celular em linhagem ARPE-19 após tratamento com LA (A) e LL (B) por 48 h.



Para os grupos que receberam LL, foi encontrada uma diferença estatística naqueles que receberam concentrações superiores a 80 $\mu\text{mol/L}$, sendo que a concentração de 640 $\mu\text{mol/L}$ foi tóxica. Sugere-se que o LL produziu um efeito citotóxico dose-dependente, o que possibilitou a geração de uma equação da curva ($y = 100/1+10^{(2.585-x) \cdot (-1,325)}$; $r^2= 0,9481$) e o cálculo da IC_{50} (figura 14-B), obtendo-se um valor de 384,4 $\mu\text{mol/L}$, após 48 horas de tratamento.

A maior atividade citotóxica da LA quando comparada ao LL corrobora com os achados de Bednarczyk-cwynara e colaboradores (2016), que sugerem que a oxidação da hidroxila a grupo cetona na posição C-3 de esqueletos lupanos, induz a formação de compostos mais citotóxicos.

Apesar dos indícios de citotoxicidade observados para determinadas concentrações dos TPs, pontua-se que essa toxicidade esteja relacionada a uma atividade direta e/ou indireta dessas substâncias sobre as células endoteliais inseridas em um sistema biológico *in vitro*, ou seja, fora do ambiente natural

(HULSART-BILLSTRÖM *et al.*, 2016). Dessa forma, esse ensaio compreende apenas uma triagem inicial para estimar a faixa de concentração de novas substâncias que visam à aplicação oftalmológica.

3.2 Avaliação da atividade antiangiogênica dos TPs em membrana corioalantoica de embrião de galinha

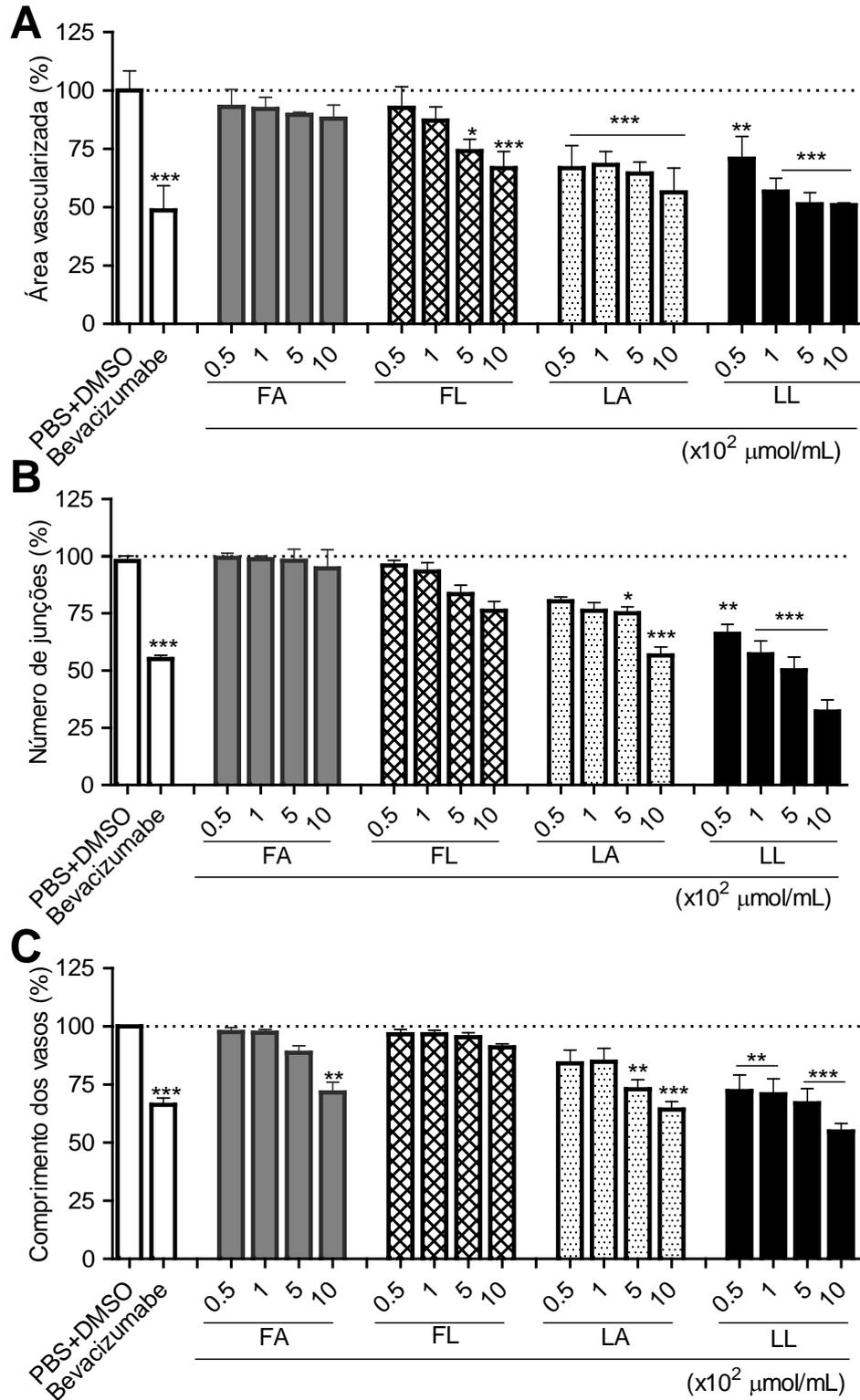
A membrana corioalantoica embrionária de galinha é uma membrana extraembrionária, bastante vascularizada, que se desenvolve em torno do conteúdo interno do ovo. Ela é formada entre o 3º e 6º dia de desenvolvimento, com a fusão do córion com o alantoide. Os vasos primitivos proliferam-se e se diferenciam em um sistema arteriovenoso até o 8º dia, com proliferação rápida até o 11º dia, quando o índice mitótico passa a decrescer e o sistema vascular atinge a sua disposição final no 18º dia, pouco antes de sua eclosão (21º dia) (EGOSHI *et al.*, 2015).

Destaca-se que é permitido o uso de embriões de galinha sem restrições éticas ou prévia aprovação de protocolo em comitê de ética, desde que os ensaios tenham início e fim antes do 14º dia do desenvolvimento embrionário, uma vez que os embriões não são capazes de sentir dor até esse período (KUE *et al.*, 2015).

Para avaliar a atividade antiangiogênica dos TPs, utilizou-se uma ampla faixa de dose (50 – 1000 µmol/L), no intuito de verificar qual a melhor correlação dose-resposta. Como os TPs são substâncias praticamente insolúveis em água e em tampão PBS (pH 7,4), foi necessária a utilização de 0,3% de DMSO (v/v) para o preparo das suspensões estoque. Como já demonstrado por Toledo e colaboradores (2019), o uso de DMSO 0,3% não é capaz de alterar de forma significativa a quantidade de vasos sanguíneos em relação ao grupo tratado com tampão PBS pH 7,4.

Como controle positivo, foi utilizada a solução de bevacizumabe 1 µmol/L, uma vez que se trata de um fármaco de ação antiangiogênica comprovada e muito utilizado na prática clínica (TOLEDO, 2018). O tratamento das membranas corioalantoicas com bevacizumabe promoveu uma redução de 51,75% na porcentagem dos vasos sanguíneos em relação ao grupo controle. Além disso, o número de junções reduziu em 33,67% e o comprimento dos vasos em 45% (figura 15).

Figura 15: Parâmetros avaliados na vasculatura corioalantoica (A) área vascularizada (%) (B) número de junções (%) (C) comprimento dos vasos (%).

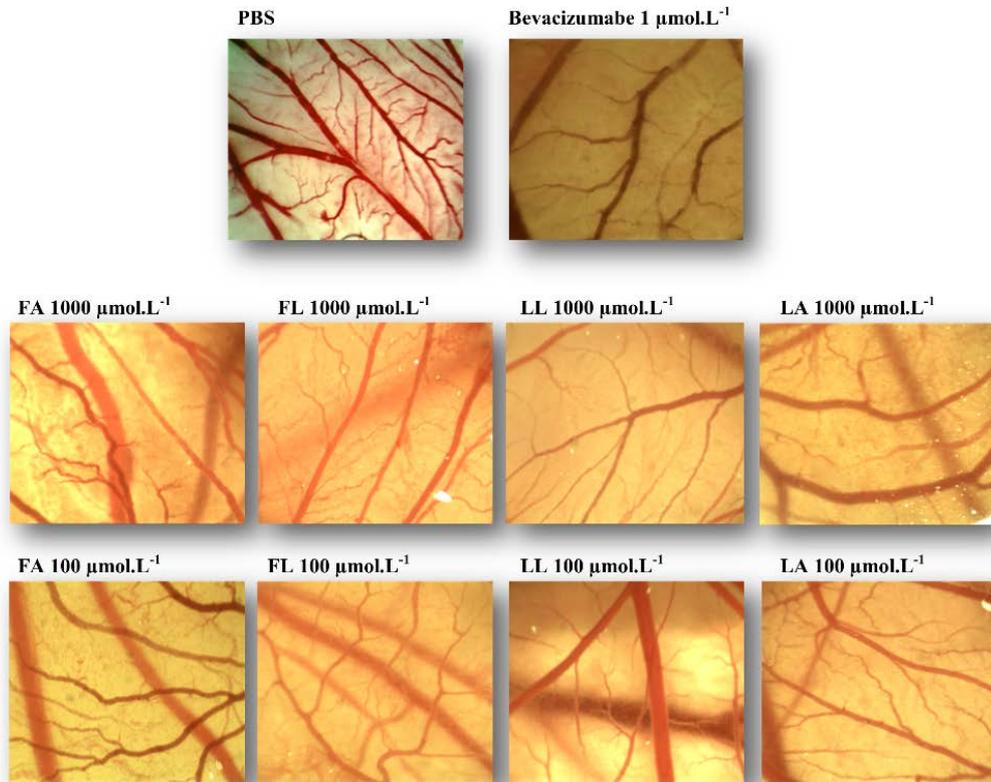


*Diferença significativa do grupo controle. Valor p <0.05; ** valor-p <0.01; ***valor-p <0.001.

Em relação aos grupos que receberam suspensões de FA, notou-se que não houve alteração relevante dos parâmetros avaliados, o que sugere a ausência da atividade antiangiogênica atribuída a essa substância na faixa de concentração de 50 a 1000 $\mu\text{mol/L}$. É possível observar uma redução no comprimento dos vasos sanguíneos das membranas tratadas com a dose de 1000 $\mu\text{mol/L}$, sugerindo uma desestabilização e/ou retardamento no crescimento dos vasos, podendo ser um indício de que, em doses superiores a 1000 $\mu\text{mol/L}$, a FA seja capaz de inibir a neovascularização. Entretanto, para confirmar essa hipótese, novos estudos devem ser conduzidos. Já o FL foi capaz de inibir a formação de novos vasos sanguíneos em doses iguais e/ou superiores a 500 $\mu\text{mol/L}$ (figura 15).

Para os grupos que foram tratados com LA e LL, notou-se uma redução da área vascularizada para ambas as substâncias. Observou-se que quanto maior a concentração do lupano aplicado, maior foi a redução do percentual de vasos sanguíneos, número de junções e no comprimento de vasos. Para o LL, uma relação de dose-dependência na faixa de doses de 50 a 500 $\mu\text{mol/L}$ foi observada. Entretanto, a LA não apresentou um perfil dose-dependente nas concentrações testadas. Ressalta-se que tanto os TPs lupanos (LL e LA) apresentaram atividade inibitória da neovascularização similar à do bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$. Além disso, em nenhum grupo, foram observados sinais de infecção, fibrose ou necrose (figura 16).

Figura 16: Imagens representativas das membranas corioalantoicas submetidas ao tratamento com os TPs nas doses de 1000 e 100 $\mu\text{mol/L}$, fotografadas no aumento de 20x.



Este é o primeiro relato na literatura a respeito da ação antiangiogênica isolada dos compostos FA, FL e LA (TOLEDO *et al.*, 2021). Para o LL, há estudos que avaliam sua atividade antiangiogênica, inclusive por meio da CAM. Ressalta-se que os resultados deste trabalho corroboram com estudos já publicados (SOARES *et al.*, 2017).

Dessa forma, de acordo com a análise realizada, considera-se que para a faixa de concentração de 50 - 1000 $\mu\text{mol/L}$, as substâncias LA e LL apresentaram-se como opções terapêuticas para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização. Além disso, sugere-se que tanto para a LA quanto para o LA, a concentração 100 $\mu\text{mol/L}$ foi a que apresentou uma melhor relação entre dose aplicada e resultado obtido.

3.3 Avaliação da segurança e toxicidade de injeções intravítreas dos TPs em modelo *in vivo*

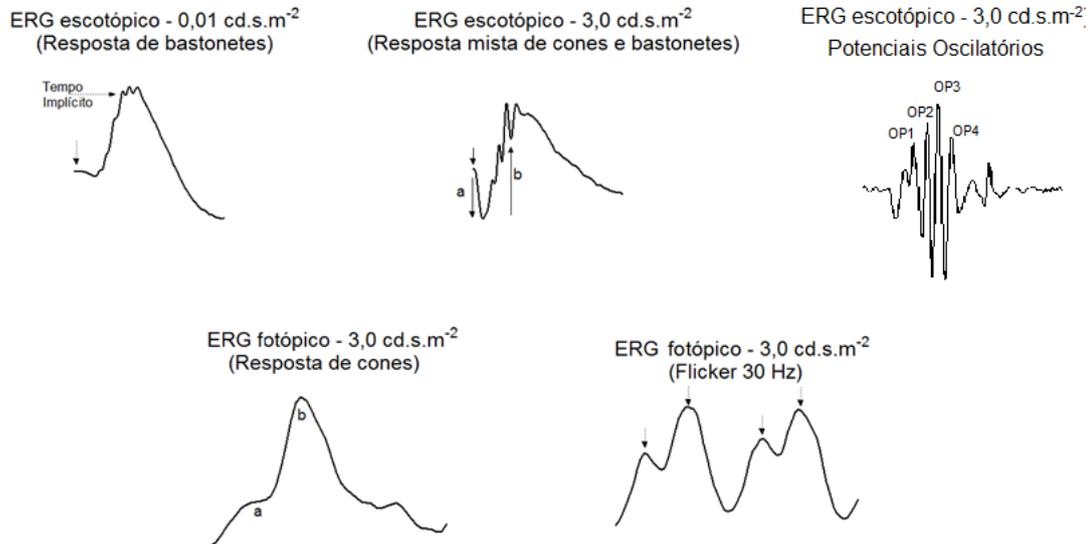
3.3.1 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma

O ERG de campo total é um exame não-invasivo e o mais utilizado em experimentação animal, tanto para avaliação funcional da retina quanto para o diagnóstico de possíveis alterações da retina (BOYES *et al.*, 2016; HUANG, W. *et al.*, 2015; NGUYEN, C. T. *et al.*, 2016). O ERG representa a atividade elétrica gerada na retina em resposta ao estímulo luminoso difuso (*flashes*). Esse procedimento permite o registro de uma onda bifásica, sob a forma senoidal, e os dois componentes considerados com maior frequência na avaliação da integridade da retina são as ondas a e b (BENCHORIN *et al.*, 2017; CLARCK; KRAFT, 2012).

A onda a é uma deflexão negativa resultante da hiperpolarização dos fotorreceptores (cones e bastonetes), devido ao fechamento dos canais de sódio da membrana plasmática do segmento externo. Já a onda b é uma deflexão positiva, originada na camada nuclear interna pelas células bipolares, em resposta às concentrações aumentadas de íons potássio no meio extracelular (HUANG, W. *et al.*, 2015). Essas ondas são caracterizadas por elementos temporais (latência, tempo implícito e duração) e bioelétricos (medida de amplitude) (figura 17). Assim, alterações nos nesses parâmetros podem representar indícios de degeneração da retina.

Há também os potenciais oscilatórios (OPs) que são oscilações observadas na fase de subida da onda-b. Embora existam controvérsias sob a origem dos OPs, estudos têm sugerido que sejam originários das células amácrinas e que estejam correlacionados à circulação na retina (HAMMOUM *et al.*, 2018; NEGRETTO *et al.*, 2008).

Figura 17: Exemplos de formas de ondas obtidas em modelos murinos de acordo com o estímulo emitido.



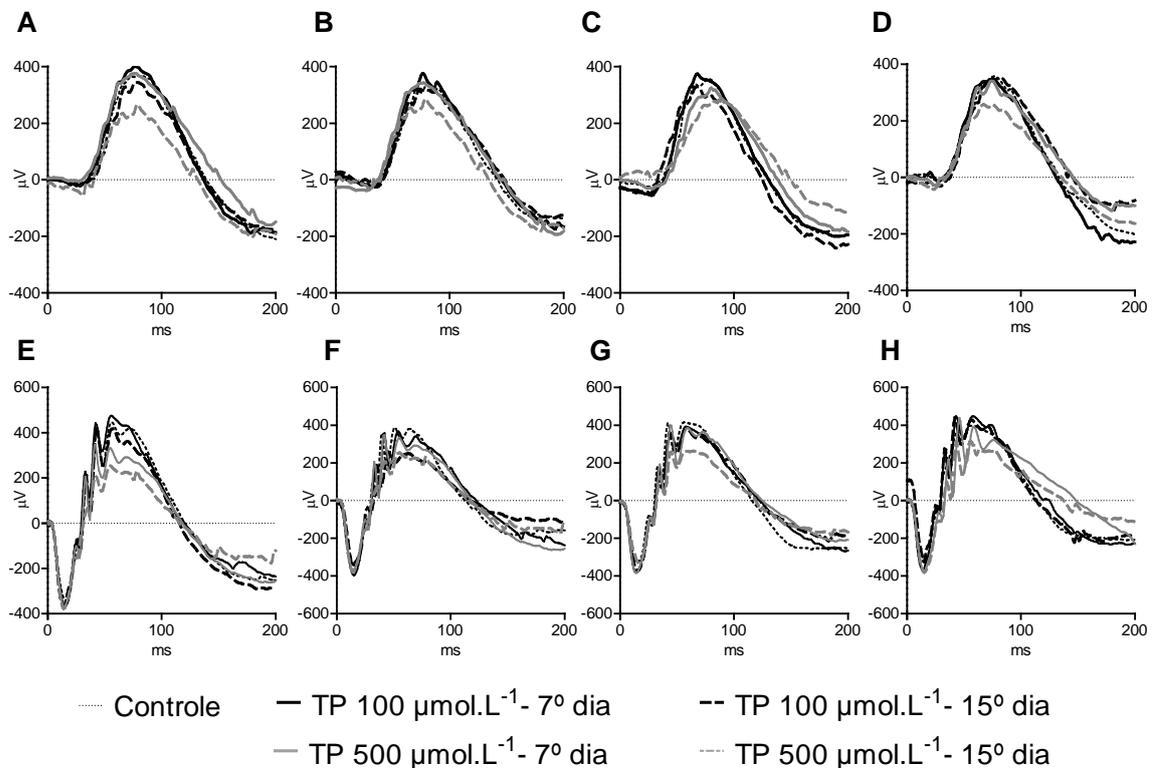
Fonte: Adaptado de TOLEDO, 2018.

Diversos estudos avaliaram a segurança da utilização de novas substâncias e de sistemas de liberação de fármacos empregando o ERG, tais como: Almeida *et al.*, 2015, Dourado *et al.*, 2020, Paiva *et al.*, 2019, Paiva *et al.*, 2021, Silva *et al.*, 2018, Souza *et al.*, 2014 e Toledo *et al.*, 2019.

Nesse trabalho, para avaliar o impacto na função retiniana decorrente da administração intravítrea dos TPs, diferentes análises das amplitudes e tempos implícitos das ondas a e b nas condições de escuro (escotópica) e luz (fotópica) foram realizadas. Primeiramente, observou-se o perfil das respostas escotópicas aos estímulos luminosos de 0,01 e 3,00 cd.s.m^{-2} . Na intensidade luminosa de 0,01 cd.s.m^{-2} , há excitação das células bipolares, gerando uma resposta dos bastonetes, levando à formação da onda b. Com o aumento da intensidade luminosa para 3,0 cd.s.m^{-2} , há a hiperpolarização dos fotorreceptores, culminando com uma resposta mista - cones e bastonetes – sendo possível observar a onda a, acompanhada da onda b.

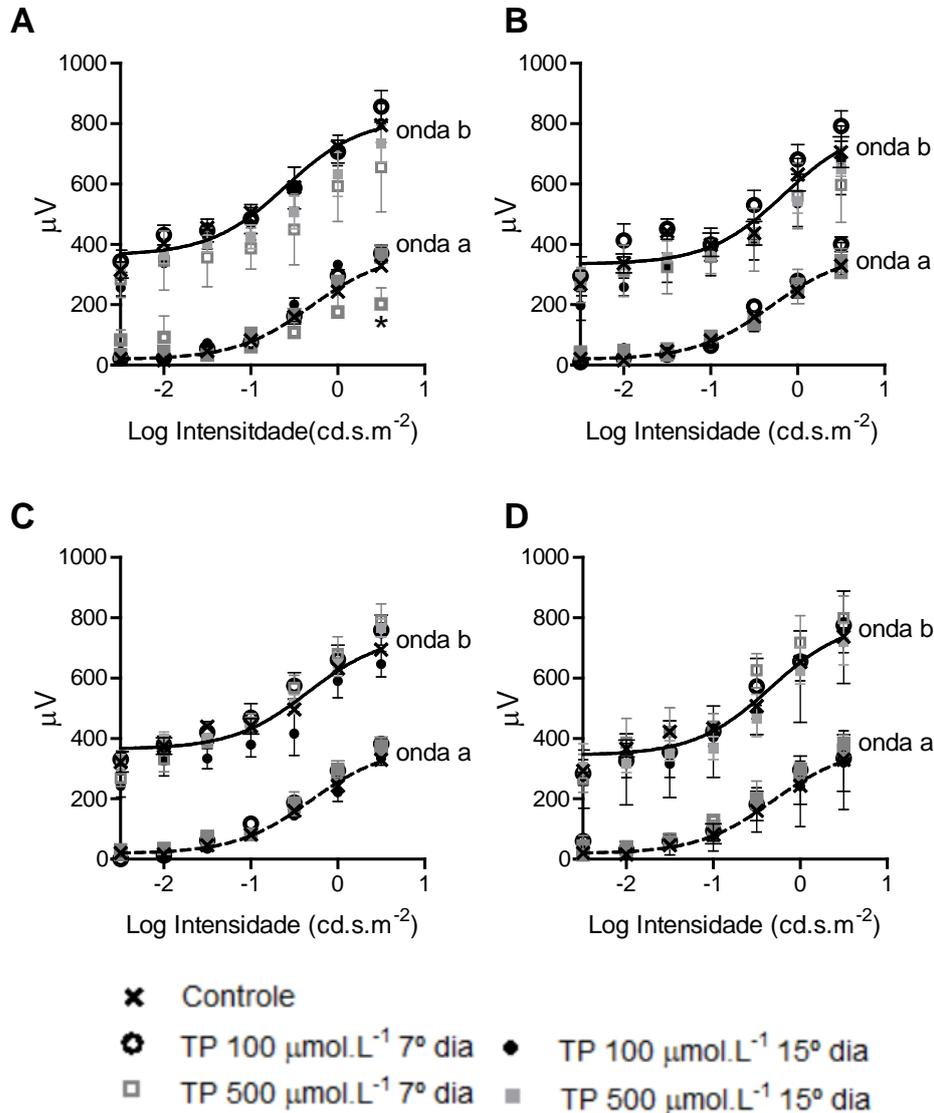
A figura 18 apresenta o perfil representativo das respostas escotópicas às intensidades luminosas de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$. Todas as curvas foram comparadas às dos olhos-controle.

Figura 18: Perfil eletrretinográfico nas condições escotópica - $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (A - D) e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (E - H) nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: FA (A e E); FL (B e F); LA (C e G); LL (D e H).



Notou-se que a resposta média dos olhos que receberam TPs, na concentração de $500 \mu\text{mol/L}$ apresentou uma discreta alteração no perfil eletrretinográfico 15 dias após a administração. Já as respostas dos olhos que receberam suspensões na dose de $100 \mu\text{mol/L}$, apresentaram um perfil retinográfico semelhante aos dos olhos controles. Para melhor compreender as alterações observadas, as amplitudes ondas a e b foram avaliadas em função do logaritmo da intensidade luminosa (figura 19). Todos os olhos foram comparados aos olhos controles.

Figura 19: Amplitudes das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: (A) FA; (B) FL; (C) LA; (D) LL.



*Diferença significativa do grupo controle. valor-p <0.05.

De acordo com a análise estatística, foi encontrada diferença significativa apenas para a amplitude da onda a do escotópico, 7 dias após a administração intravítrea da dose de FA 500 $\mu\text{mol/L}$. Houve uma redução de cerca de 36,0 % da amplitude da onda em relação ao grupo controle. Essa alteração pode ser considerada como transitória, pois nenhuma alteração significativa foi detectada 15

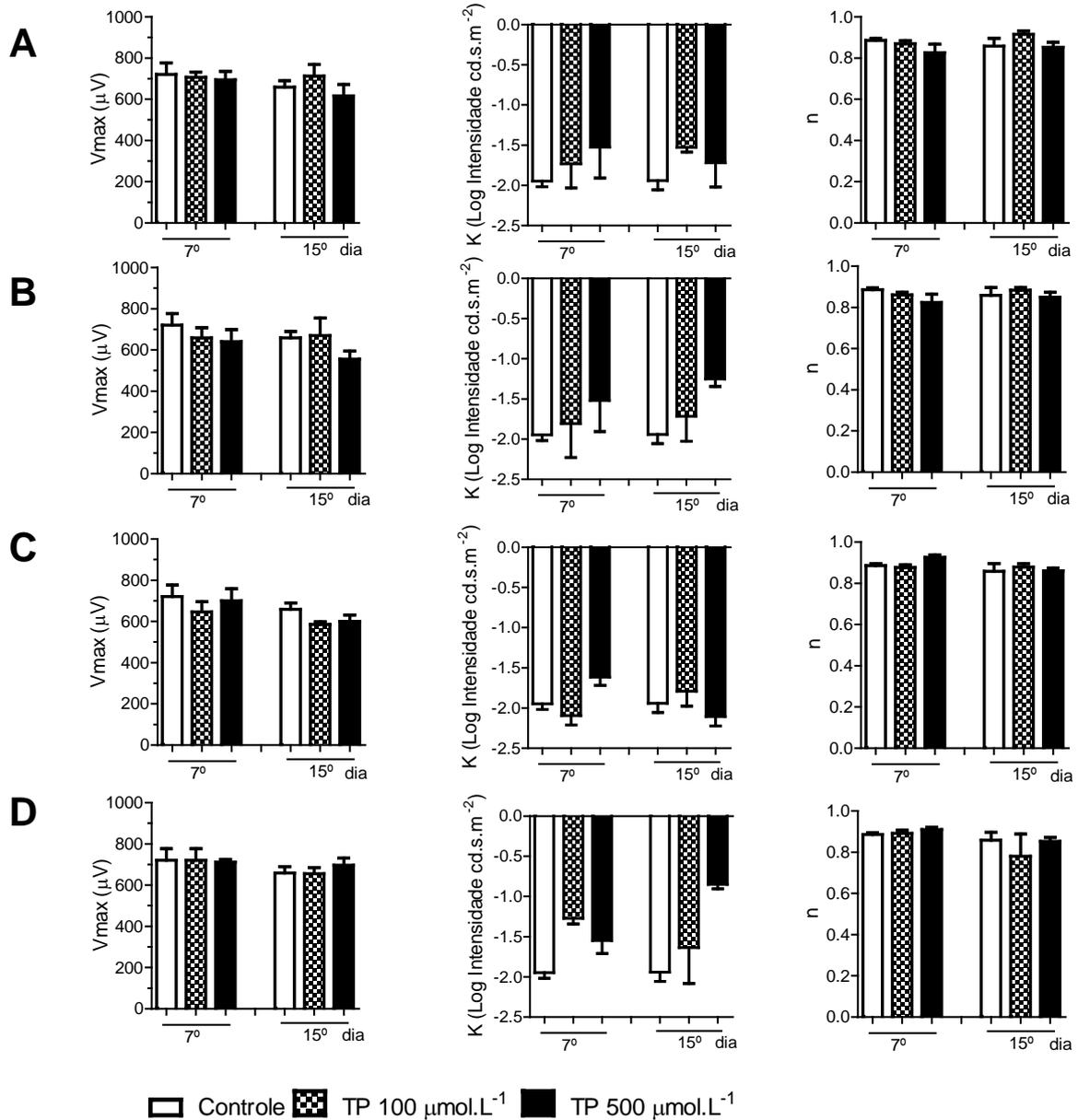
dias após a aplicação intravítrea da FA 500 µmol/L. Para os outros grupos, não foi verificada nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados.

Em seguida, a relação entre a amplitude da onda-b e o logaritmo da intensidade luminosa foi analisada segundo a equação de Naka-Rushton:

$$V/V_{\max} = I^n / (I^n + k^n) \quad (2)$$

Em que V é a amplitude da onda-b para um estímulo luminoso específico (I) que é determinado por três parâmetros: amplitude saturada (máxima) da onda-b (V_{\max}); a constante de semissaturação (k) que é a intensidade de luz necessária para que a onda-b alcance metade de V_{\max} ; e um expoente n , que se refere à inclinação da porção linear da função, representando o arranjo da dinâmica das medidas da onda e a sensibilidade da função retiniana, ou seja, é a inclinação quando I é igual a K (IOSHIMOTO, 2015). A figura 20 apresenta os parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton em diferentes tempos. De acordo com a análise estatística, não foi verificada nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados (V_{\max} , K e n), indicando que a resposta retiniana máxima à luz não foi prejudicada pelos TPs em teste.

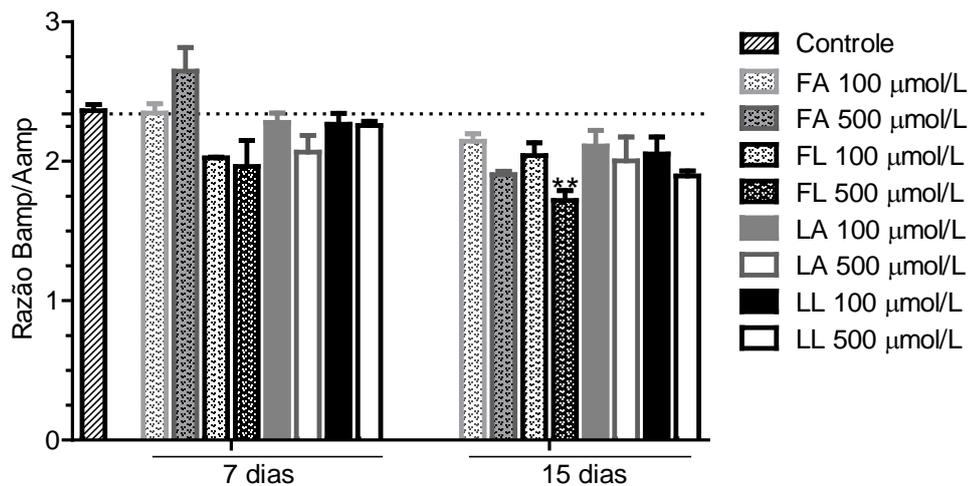
Figura 20: Parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton (V_{max} , K , n) nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: (A) FA; (B) FL ;(C) LA; (D) LL.



Outro parâmetro utilizado com frequência como indicador da integridade funcional da retina é a relação do quociente entre as amplitudes das ondas b e a (razão B_{amp}/A_{amp}), em condições escotópicas, mediante intensidade luminosa de 3,0 $cd.s.m^{-2}$. A razão B_{amp}/A_{amp} reflete a integridade da transmissão de sinais entre as células bipolares e os fotorreceptores. Portanto, uma alteração dessa razão

pode estar associada a uma lesão na transmissão sináptica entre os fotorreceptores e as células bipolares (MANNA *et al.*, 2016). Essa relação foi investigada para todas as substâncias em cada intervalo de tempo analisado (figura 21).

Figura 21: Razão Bamp/Aamp nos tempos 7 e 15 dias após injeção intravítrea dos TPs, em condição escotópica e intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m⁻².



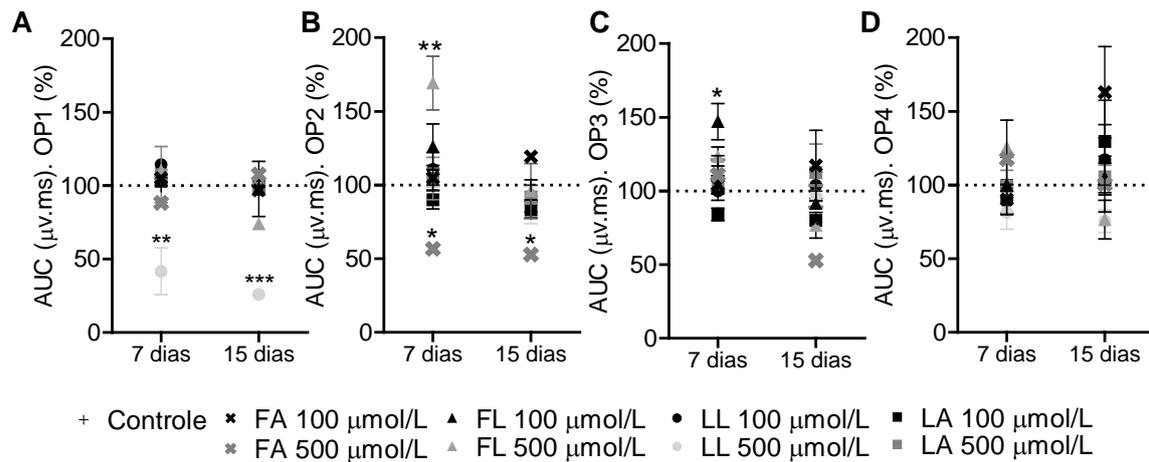
*Diferença significativa do grupo controle; ** valor-p <0.01.

Para os olhos que receberam TPs na dose de 100 µmol/L, FN, LL e LA na concentração de 500 µmol/L, não foram verificadas alterações relevantes na razão Bamp/Aamp em nenhum dos tempos avaliados. Porém, foram observadas diferenças significativas 15 dias após a administração intravítrea das suspensões de FL na concentração de 500 µmol/L, sendo um indício de toxicidade à retina.

Empregando-se a metodologia descrita por Dong e colaboradores (2004), avaliou-se, também, a área sob a curva (AUC) dos 4 OPs gerados durante os exames escotópicos sob a intensidade luminosa de 3,00 cd.s.m⁻² (figura 17). Em seguida, a AUC de cada OP foi calculada em termos percentuais em relação à AUC do grupo controle. Segundo Kizawa (2006) e Negretto (2008), os OPs são parâmetros bastante sensíveis e, portanto, podem ser detectadas alterações neles, mesmo em situações em que as respostas dos fotorreceptores mantiveram-se íntegras, com ondas a e b de latência e amplitudes dentro da normalidade. Em geral, alterações dos OPs são detectadas em estágios precoces de retinopatia diabética

(DONG; AGEY; HARE, 2004; NEGRETTO *et al.*, 2008). A figura 22 apresenta a área sob a curva de cada um dos 4 OPs em função do período de estudo.

Figura 22: Área sob a curva dos potenciais oscilatórios nos tempos 7 e 15 dias após injeção intravítrea dos TPs, em condição escotópica e intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m⁻².

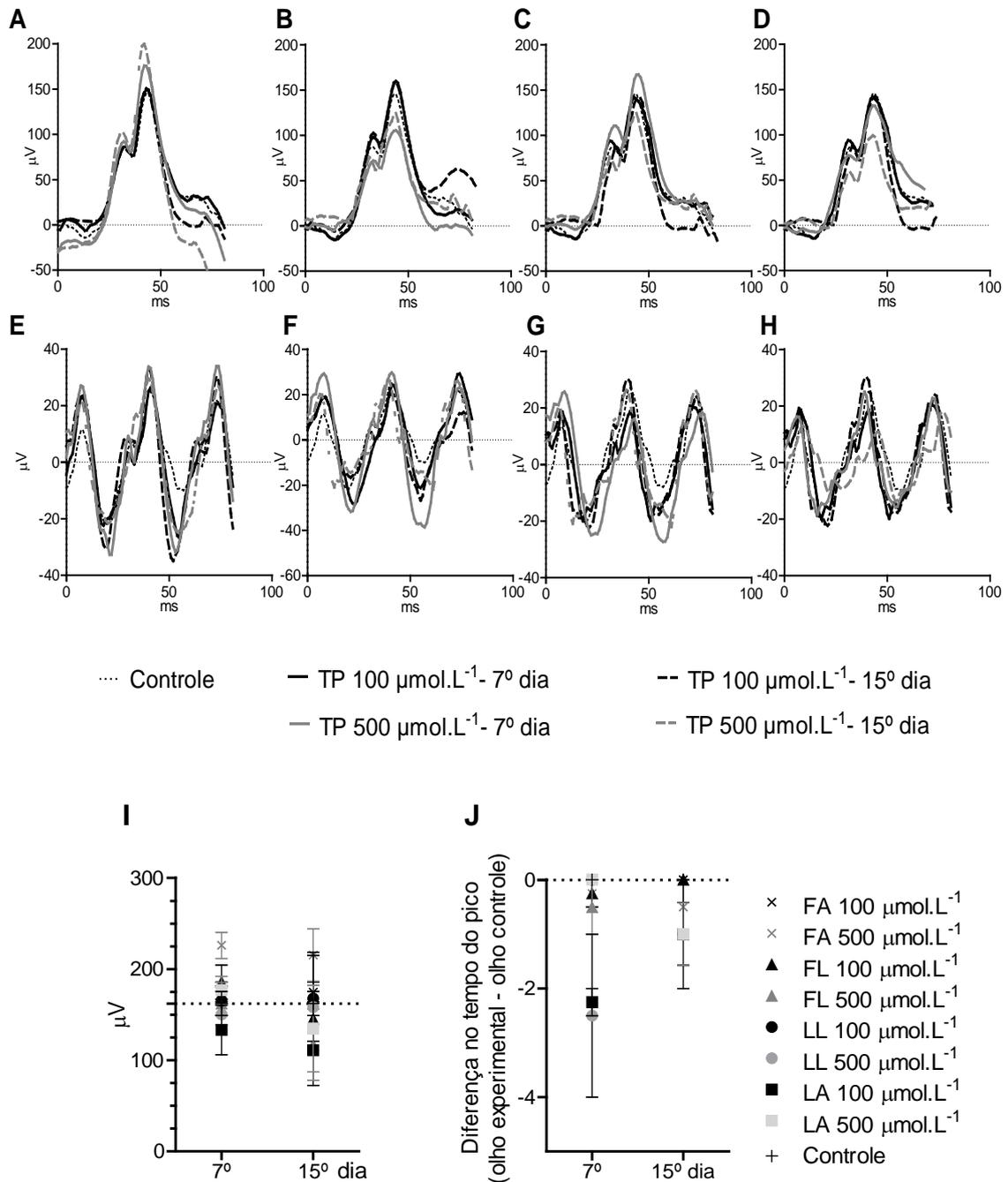


*Diferença significativa do grupo controle; valor-p <0.05;** valor-p <0.01;***valor-p <0.001.

Foram verificadas alterações significativas da AUC dos OPs nos grupos que receberam LL, FA e FL na concentração de 500 μmol/L. Não foram detectadas diferenças estatísticas para os olhos que receberam os TPs a 100 μmol/L e LA 500 μmol/L.

Por fim, observou-se o perfil das respostas fotópicas à intensidade luminosa de 3,00 cd.s.m⁻² e ao *flicker* de 30 Hz. A condição fotópica permite a avaliação da resposta quase que exclusiva dos cones. Como demonstrado na figura 23 (A-H), a resposta eletrorretinográfica dos olhos que receberam a administração intravítrea dos TPs foi semelhante à dos olhos controles. Avaliou-se também a amplitude da onda-b em resposta à intensidade luminosa de 3,00 cd.s.m⁻² (figura 23-I) e a diferença no tempo do pico mediante *flicker* de 30 Hz (figura 23-J). Não foi verificada nenhuma alteração significativa nesses parâmetros, indicando que a atividade dos cones foi preservada após a administração das suspensões de TPs.

Figura 23: Perfil eletrorretinográfico da resposta fotópica na intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (A - D) e flicker de 30 Hz (E - H) nos tempos 7 e 15 dias após a administração intravítrea dos TPs: FA (A e E); FL (B e F); LA (C e G); LL (D e H). (I) amplitude da onda-b na condição fotópica com luminância de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$; (J) diferença do tempo de pico entre olhos controles e experimentais mediante flicker de 30 Hz.



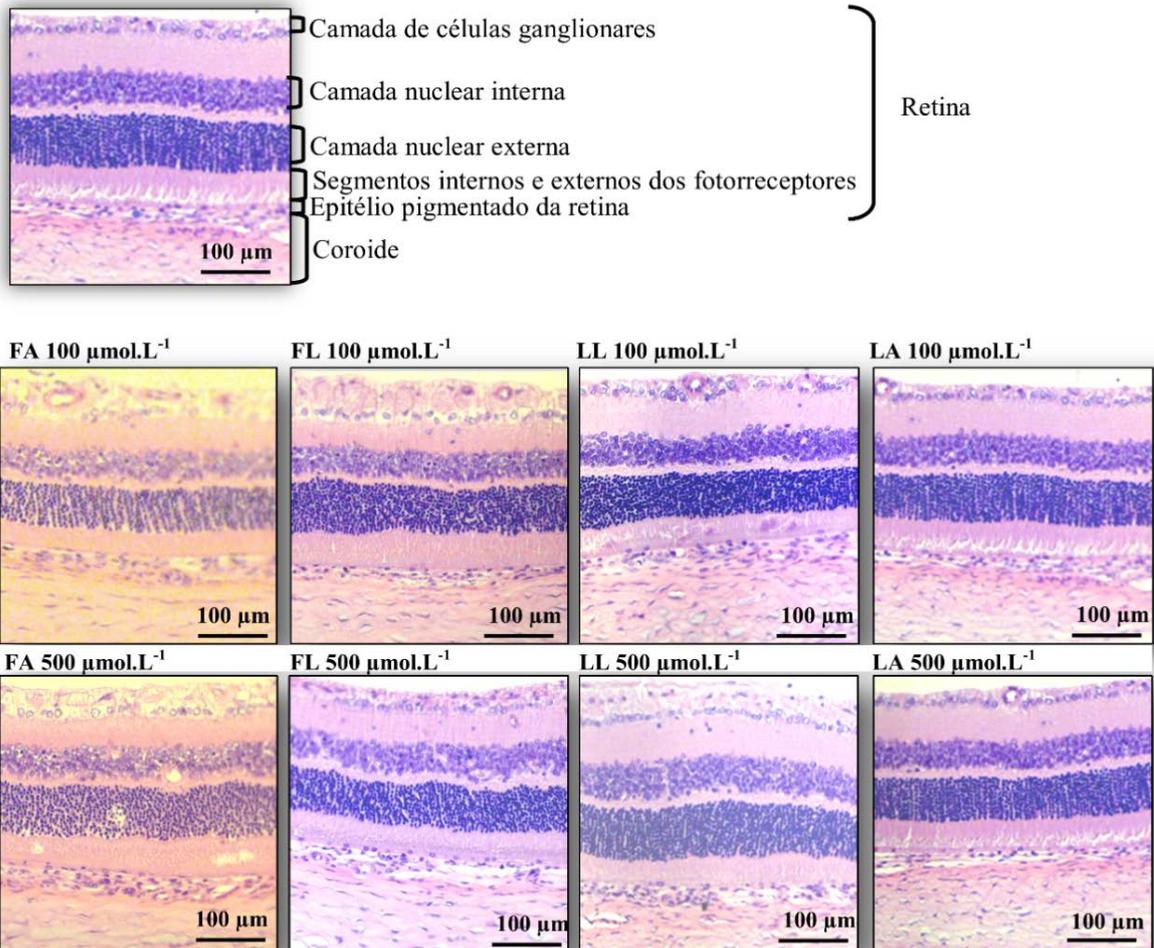
Dessa forma, de acordo com todas as análises de ERG realizadas, notou-se que a administração intravítrea dos TPs em concentrações de 100 $\mu\text{mol/L}$ não apresentou efeitos tóxicos sobre a retina e, portanto, pode-se sugerir que são seguras para uso oftálmico nessa dosagem (NAGAI *et al.*, 2018). Em relação à administração intravítrea dos TPs na dose de 500 $\mu\text{mol/L}$, houve indícios de toxicidade das amostras sobre a retina, salvo à exceção da LA 500 $\mu\text{mol/L}$ e, portanto, não foram consideradas seguras para a administração no segmento posterior do olho.

Acredita-se que essa toxicidade de FA, FL, LL na concentração de 500 $\mu\text{mol/L}$ possa estar relacionada à baixa solubilidade desses compostos em ambiente aquoso (corpo vítreo), presumindo que apresentem um perfil de liberação prolongada. Dessa forma, à medida que aumenta a “liberação”, há um aumento da concentração do TP no corpo vítreo, atingindo um valor tóxico à retina. Comportamentos semelhantes a esses já foram descritos para outros fármacos hidrofóbicos (TOTH; SEIDER; CHEN, 2016), inclusive para um triterpeno (TOLEDO *et al.*, 2019). Para verificar se essa é uma tendência real dos TPs em análise, estudos de longa duração e farmacocinéticos fazem-se necessários, no intuito de compreender a liberação, distribuição e comportamento dos TPs no segmento posterior do olho.

3.3.2 Avaliação histológica

A organização das camadas das retinas mostrou-se semelhante à observada nos olhos controle. Além do mais, não houve evidências de desalinhamento, de diminuição da espessura ou do número de células das camadas da retina. Também não foram encontrados sinais de edema, inflamação, necrose e/ou fibrose (figura 24).

Figura 24: Imagens representativas das retinas de rato coradas por HE 15 dias após a injeção intravítrea dos TPs.



4 CONCLUSÃO

Face à ausência de estudos relacionados à aplicação oftálmica dos TPs (FA, FL, LA e LL), o ensaio de toxicidade em células ARPE-19 auxiliou na estimativa da faixa de concentração a ser empregada em ensaios *in vivo*. Por meio da CAM, modelo *in vivo* utilizado para mimetizar a ação de substâncias e seus efeitos na microvasculatura da retina, notou-se que os TPs de esqueleto lupano apresentaram elevado potencial antiangiogênico, sendo comparável ao do padrão bevacizumabe 1 $\mu\text{mol/L}$. Além disso, notou-se que na concentração 100 $\mu\text{mol/L}$, tanto LA quanto LL, apresentaram a melhor relação entre dose aplicada e resultado obtido.

Empregando-se o exame eletrofisiológico e a avaliação histológica, que são parâmetros importantes na avaliação de segurança da administração intravítrea de novos fármacos, os TPs FA, FL e LL (nas concentrações de 100 $\mu\text{mol/L}$) e a LA (em concentrações até 500 $\mu\text{mol/L}$) não apresentaram indícios de efeitos tóxicos sob a retina, sugerindo segurança na aplicação oftálmica da FA, FL, LL e LA. Além disso, sugere-se que o LA e LL a 100 $\mu\text{mol/L}$ apresentam-se como opções farmacoterapêuticas promissoras para o tratamento de doenças oftálmicas que envolvam a neovascularização ocular.

Levando-se em consideração a literatura disponível referente à atividade anti-inflamatória dos TPs de esqueleto lupano e os resultados obtidos neste capítulo, prosseguiu-se com a investigação da atividade anti-inflamatória dos lupanos LL e LA (100 $\mu\text{mol/L}$) em tecidos oculares utilizando-se modelos *in vitro* e *in vivo*.

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO LUPEOL E LUPENONA EM MODELO DE UVEÍTE EXPERIMENTAL

1 MATERIAIS

1.1 TPs isolados de plantas do gênero *Maytenus*

LL (massa molar 426,79 g/mol) e LA (massa molar 424,71 g/mol) foram cedidos pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Plantas Medicinais do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil. O acesso a esses TPs está registrado no CGen / SisGen sob os números AEED846 e A0B3BAC. Esses triterpenos isolados foram caracterizados por meio de análises espectrais (infravermelho e RMN) e determinação do ponto de fusão (MAGALHÃES *et al.*, 2011; SOUSA, G. F. *et al.*, 2014)

1.2 Reagentes e outros materiais

a) Para avaliação da atividade anti-inflamatória em células ARPE-19: Linhagem celular ARPE-19 (ATCC® CRL-2302); SFB e antibiótico PSA 100x da Gibco, EUA. Meio de cultura DMEM F-12, tripsina-EDTA, lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS O111:B4 L2630) da Sigma-Aldrich, EUA. Kit customizado Legendplex® humano com *beads* para citometria (Biolegend, EUA). Fosfato dissódico de dexametasona (solução injetável de Decadron®, 4 mg/mL).

b) Para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* em modelo experimental de uveíte: *Mycobacterium bovis bacillus* Calmette-Guérin (BCG) da Fundação Ataulpho de Paiva, Brasil; Montanide® (óleo mineral injetável) ISA50 V2 (Seppic, França). Agulhas BD ultrafine II (0,3 mm); cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% (Anestésico®, Allergan, EUA), tropicamida 10 mg/mL (Mydriacyl®, Alcon, EUA). Cloridrato de ketamina (Dopalen®) e cloridrato de xilazina (Anasedan®) de Ceva, Brasil. Kit de ensaio de atividade de N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HETAB) e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), BSA (bovine serum albumin) da Sigma-Aldrich, EUA. Ácido sulfúrico da Merck Milipore, EUA. DMSO, fosfato trissódico, fosfato de sódio bibásico anidro, fosfato de potássio monobásico anidro, cloreto de sódio, cloreto de potássio, tween 20, peróxido de hidrogênio e triton-X da Synth, Brasil.

1.3 Equipamentos e acessórios

Sistema de purificação de água Milli-Q® (Merck Millipore, EUA), balança analítica (Sartorius, Alemanha), agitador vórtex (IKA Werke, Alemanha), leitor de microplacas Spectramax® 190 (Molecular devices LCC, EUA), centrífuga GS-6R (Beckman Coulter Life Sciences, EUA), centrífuga Sorval Legend XTR (Thermo Scientific, EUA), citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences EUA), microscópio óptico Axio Imager M2 (Zeiss, Alemanha), eletrorretinograma (ERG) Espion E² Colordome™ (Diagnosys LLC, EUA), eletrodo unipolar do tipo lente sobre a córnea (eletrodos LKC ERG Jet – R225, Fabrinal SA, Suíça), eletrodos de referência do tipo agulha (ERG Jet, Fabrinal SA, Suíça), oftalmoscópio binocular indireto (Welch Allin, Brasil), centrífuga (Thermo Scientific, EUA).

1.4 Animais

Sessenta ratos adultos machos da espécie Wistar, com cerca de 150 g, foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Farmácia - UFMG. Durante o período de estudo, os animais foram mantidos no Biotério, dentro de caixas com grades contendo três animais e em estante ventilada, sob condições controladas de temperatura (27 ± 1 °C) e luminosidade (ciclo claro e escuro de 12 horas, com luz iniciando às 7 horas) e com livre acesso à ração e água.

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e Visão da ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) e com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), o qual aprovou a realização do projeto sob o protocolo de número 221/2019 (Anexo 1).

2 MÉTODOS

2.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)

2.1.1 Preparo das soluções estoques a 4000 µmol/L

Foram preparadas duas soluções estoques: LL 4000 µmol/L e LA 4000 µmol/L. Como os TPs apresentam massas molares semelhantes, adotou-se o mesmo procedimento para o preparo das soluções-estoque de cada um deles.

Foram pesados $1,80 \pm 0,02$ mg do TP em um microtubo. Adicionou-se 1 mL de DMSO e agitou-se por 1 minuto em agitador orbital, obtendo-se uma solução de concentração de 4000 µmol/L.

2.1.2 Avaliação do efeito dos lupanos sobre a produção de citocinas pelas células ARPE-19 após estímulo com LPS

Para avaliar o efeito do tratamento prévio com os lupanos (100 µmol/L) sobre a produção de citocinas inflamatórias pelas células ARPE-19 após estímulo com LPS (10 µmol/L), o kit customizado de *beads* para citometria (Legendplex®) foi utilizado. Assim, foi possível quantificar as citocinas IL-6 e IL-8 no sobrenadante das células após o estímulo. Essa avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória foi realizada no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores da Faculdade de Farmácia, UFMG.

Para a realização desse ensaio, células da linhagem ARPE-19 foram cultivadas em meio DMEM-F12, suplementado com 10% de SFB e 1% PSA e mantidas em atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

A suspensão de células ARPE-19 (1×10^4 células/100 µL) em DMEM-F12 suplementado (PSA 1% e SFB 10%) foi adicionada à placa de 96 poços, a qual foi incubada (37 °C / 5% CO₂) até as células atingirem 80-90% de confluência. Após esse período, o meio foi removido e as células receberam os seguintes tratamentos (n=4/grupo):

- ✓ LA 100 µmol/L (por 1 hora) seguido de LPS (10 µg/mL) em meio de cultura sem suplementação por 24 horas;

- ✓ LL 100 $\mu\text{mol/L}$ (por 1 hora) seguido de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) em meio de cultura sem suplementação por 24 horas;
- ✓ Fosfato de dissódico de dexametasona (Dexa) 4 mg/mL (por 1 hora) seguido de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) em meio de cultura sem suplementação por 24 horas;
- ✓ Meio de cultura suplementado com 1% de SFB por 1 hora, seguido de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) em meio de cultura sem suplementação por 24 horas (controle positivo);
- ✓ Meio de cultura suplementado com 1% de SFB por 1 hora seguido de meio sem suplementação durante 24 horas (controle negativo).

As soluções dos lupanos foram preparadas em meio DMEM-F12 suplementado com 1% de SFB, enquanto a suspensão de LPS foi preparada em DMEM-F12 sem suplementação. As células foram lavadas duas vezes com meio sem suplementação, antes de iniciar os tratamentos. Após 24 horas, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado (1000 rpm, 4 °C, 10 minutos) para remoção de *debris* celulares. O ensaio foi então realizado conforme instruções do fabricante.

Em uma placa de fundo em V foram adicionados volumes iguais de tampão de ensaio, sobrenadante das células (em duplicata) ou pontos da curva padrão (em duplicata) e as *beads* (após mistura de todas as *beads* 13x e diluição para 1x). A placa foi selada, protegida da luz e, em seguida, mantida no agitador de placas durante 2 horas, com agitação moderada em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi centrifugada (1050 rpm / 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado, vertendo-se a placa em um movimento único e contínuo. A placa foi então lavada com 200 μL de tampão de lavagem por poço, seguido de centrifugação (1050 rpm / 5 minutos) e descarte do sobrenadante. Neste momento, o anticorpo de detecção foi adicionado, no mesmo volume utilizado para os demais reagentes da primeira etapa. A placa foi selada, protegida da luz e mantida sob agitação constante durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, o SA-PE foi adicionado no mesmo volume dos demais reagentes, a placa foi selada, protegida da luz e mantida sob agitação moderada durante 30 minutos. Após lavagem das placas nas condições já descritas, 200 μL de tampão de lavagem foram adicionados a cada poço, homogeneizando os *pellets*. As amostras foram transferidas para tubos de FACs e mantidas *overnight* de 2-8 °C até a leitura no dia seguinte. A leitura das amostras foi realizada em um citômetro de fluxo, após ajustes de voltagem e ganho com as *raw beads* fornecidas no kit, até observar separação das duas populações,

de tamanhos diferentes e com intensidades diferentes dentro de cada população. Com os *gates* e demais parâmetros estabelecidos, cada amostra foi homogeneizada em vórtex durante 30 segundos e, em seguida, analisada no citômetro, em fluxo médio, até adquirir 2100 eventos por amostra. Os dados gerados no citômetro foram analisados no software LEGENDplex® Data Analysis, fornecido pelo fabricante Biolegend. Os valores foram comparados por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Turkey, utilizando o programa GraphPad Prism® 4 e adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em modelo experimental de uveíte induzida por BCG em ratos

2.2.1 Preparo da suspensão de sensibilização (BCG 2,6 mg/mL)

Foram pesados $16,00 \pm 0,16$ mg de BCG (extrato de *Mycobacterium bovis*) em um tubo falcon. Foram adicionados 3 mL do adjuvante de montanide e 3 mL de tampão PBS estéril pH 7,4. A emulsão foi agitada por 30 segundos em agitador orbital. A suspensão de sensibilização foi preparada antes da administração subcutânea.

2.2.2 Preparo das suspensões tratamento

Antes da administração intravítrea, foram preparados 1,50 mL de uma suspensão contendo $6,00 \pm 0,06$ mg de BCG em tampão PBS estéril pH 7,4.

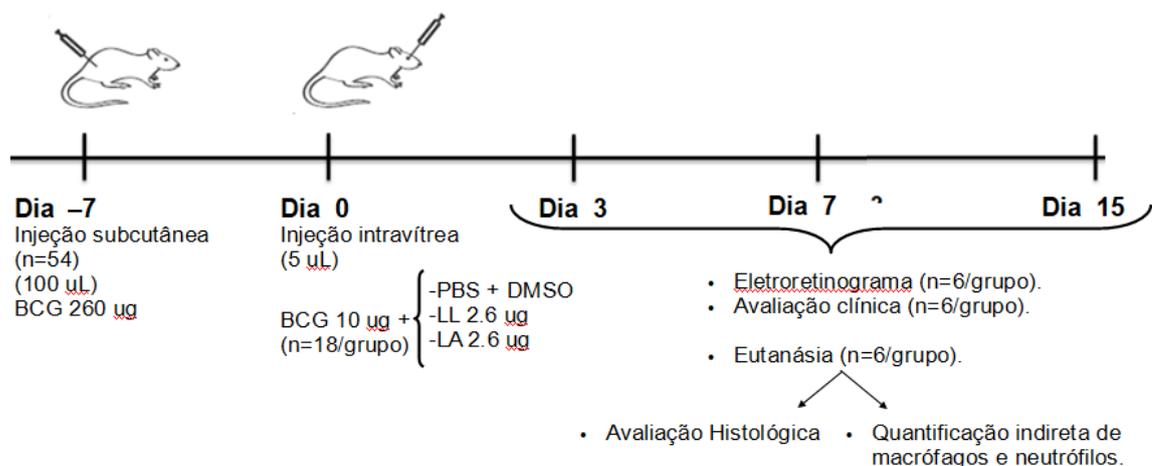
Em seguida, transferiu-se 0,5 mL dessa suspensão-estoque de BCG para um microtubo contendo 0,5 mL de tampão PBS, agitou-se por 30 segundos, obtendo-se uma suspensão de BCG na concentração de $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (grupo veículo).

Para o preparo da suspensão a ser administrada no grupo que recebeu o tratamento com LL, foram transferidos 0,5 mL da suspensão-estoque de BCG, para um microtubo contendo a 0,5 mL da suspensão de LL a $2,44 \text{ mmol/L}$ e, agitou-se por 30 segundos, obtendo-se uma suspensão de BCG na concentração de $2,0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e LL $1,22 \text{ mmol/L}$. Adotou-se o mesmo procedimento para o preparo da suspensão a ser administrada no grupo tratado com a LA.

2.2.3 Indução da uveíte

O protocolo de indução da uveíte foi baseado na metodologia desenvolvida por Castro *et. al* (2020) e Paiva *et. al* (2021). O modelo mencionado foi adaptado e executado conforme o desenho experimental disposto na figura 25.

Figura 25: Esquema do protocolo utilizado para indução de uveíte pelo BCG em ratos.



Fonte: Adaptado de CASTRO, 2020.

Nesse experimento, foram utilizados 60 animais, sendo 06 mantidos como controle saudável. Os outros 54 ratos foram submetidos ao procedimento de indução da uveíte e divididos em 3 grupos (n = 18), de acordo com o tratamento intravítreo recebido (veículo, LA 100 µmol/L e LL 100 µmol/L).

Os animais foram sensibilizados por meio da administração subcutânea de 100 µL da suspensão de BCG a 2,6 mg/mL. Após 7 dias, os animais e os olhos foram anestesiados, segundo procedimento descrito no capítulo I, item 2.3.2, pág. 49. Em seguida, realizou-se a administração intravítrea (5 µL) de 10 µg de BCG para indução da inflamação ocular. Em concomitância à administração do BCG, os olhos receberam, na mesma injeção, o tratamento, de acordo com o grupo designado (veículo, LL ou LA).

Nos dias 3, 7 e 15, após a indução da uveíte e administração do tratamento, os animais foram submetidos a avaliações eletroretinográficas e clínicas. O ERG foi

realizado de acordo com o procedimento descrito no capítulo I, item 2.3.3, pág 50. Os animais saudáveis (n=6) também participaram das avaliações clínicas e eletrorretinográficas.

Além disso, nesses mesmos intervalos de tempo, seis animais de cada grupo submetido à indução da uveíte foram eutanasiados e os olhos enucleados. Desses doze olhos, seis foram destinados para a coleta de tecidos (segmento posterior do bulbo ocular). As amostras coletadas foram armazenadas sob refrigeração a -80°C.

Os outros olhos foram destinados à análise histológica, que foi realizada de acordo com o procedimento descrito no capítulo I, item 2.3.4, pág. 51. Os animais saudáveis foram sacrificados apenas no 15º dia e os olhos passaram pelo mesmo procedimento descrito acima.

2.2.4 Avaliação clínica

A avaliação clínica dos animais saudáveis e com uveíte foi realizada nos dias 3, 7 e 15 pelos oftalmologistas Dr. Daniel V. V. Santos e Sarah P. F. Cenachi.

A avaliação clínica foi realizada empregando-se a biomicroscopia de lâmpada de fenda e oftalmoscopia binocular indireta. Foram avaliados os seguintes parâmetros: hiperemia conjuntival, congestão de vasos na íris, presença de células, *flare*, membranas de fibrina, *haze* (opacidade) vítreo, membranas inflamatórias, hiperemia do disco óptico, descolamento e hemorragia de retina.

2.2.5 Avaliação indireta da presença de macrófagos e neutrófilos

A avaliação da presença de macrófagos e neutrófilos na retina foi realizada por meio da dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetilglicosaminidase (NAG), que estão presentes nos neutrófilos e macrófagos, respectivamente.

As amostras do segmento posterior, coletadas nos dias 3, 7 e 15 foram suspensas em 500 µL de tampão de extração de citocinas, preparado conforme quadro 3.

Quadro 3: Componentes da solução de extração de citocinas

Componente	Concentração final em tampão fosfato
NaCl	23,4 mg/L
Tween 20	500,0 µL/L
Albumina sérica bovina (BSA)	5,0 g/L
Fluoreto de fenilmetanosulfonil	17,0 mg/L
Cloreto de benzetônio	44,8 mg/L
EDTA (0,1 M)	3,72 mg/L
Aprotinina	20,0 µL/L

Em seguida as amostras foram homogeneizadas em ultraturrax e centrifugadas a 10.000 rpm (5000 g) durante 10 minutos a 4 °C. Coletou-se o *pellet*.

As amostras de *pellet* foram homogeneizadas em tampão pH 4,7 (NaCl 0,1 mol/L, Na₃PO₄ 0,02 mol/L, Na₂EDTA 0,015 mol/L), centrifugadas a 4 °C e 10.000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e ao *pellet* foi adicionado 500 µL de NaCl 0,2% (p/v) gelado e, depois, NaCl a 1,6% (p/v) gelado e acrescido de 5% (p/v) de glicose. As amostras foram homogeneizadas e divididas entre os ensaios NAG e MPO. As amostras foram centrifugadas, os *pellets* reservados e os sobrenadantes descartados.

Para o ensaio do MPO, o *pellet* foi ressuspensão em tampão Na₃PO₄ (0,05 M, pH 5,4), contendo 0,5% (p/v) de HETAB, seguido de três ciclos de congelamento-descongelamento, utilizando nitrogênio líquido, e centrifugado a 10.000 rpm, a 4 °C, por 15 minutos.

Após a centrifugação, plaqueou-se 25 µL do sobrenadante em placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 25 µL de TMB 3,8 mg/mL (diluído em DMSO) e a placa foi incubada a 37 °C por 5 minutos. Foram adicionados 5 µL de H₂O₂ (0,002%, v/v) e, novamente, incubou-se a placa a 37 °C por 5 minutos. Para interromper a reação, foram adicionados 100 µL de H₃SO₄ 1 mol/L. Fez-se a leitura da absorbância a 450 nm.

Para o ensaio do NAG, o *pellet* foi homogeneizado em uma solução (500 µL) de NaCl 0,9% (p/v) e Triton X-100 0,1% (v/v) gelado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e diluído (1:1) em tampão citrato/fosfato pH 4,5 (ácido cítrico 0,1 M e NaH₂PO₄ 0,1 M).

As amostras diluídas foram plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas a 37 °C durante 10 minutos com 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-b-glucosaminidase 2,24

mmol/L (em tampão citrato/fosfato de sódio pH 4,5). Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão de glicina 0,2 mol/L, pH 10,6, para interromper a reação.

A hidrólise do substrato foi determinada medindo-se a absorbância a 405 nm. Cada amostra foi analisada em triplicata e a média dos valores obtidos em grupo foi usada para determinar a atividade da enzima.

Os dados dos ensaios de MPO e NAG foram avaliados por meio de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, adotando-se um nível de significância de $\alpha < 0,05$, utilizando-se o GraphPad Prism®5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

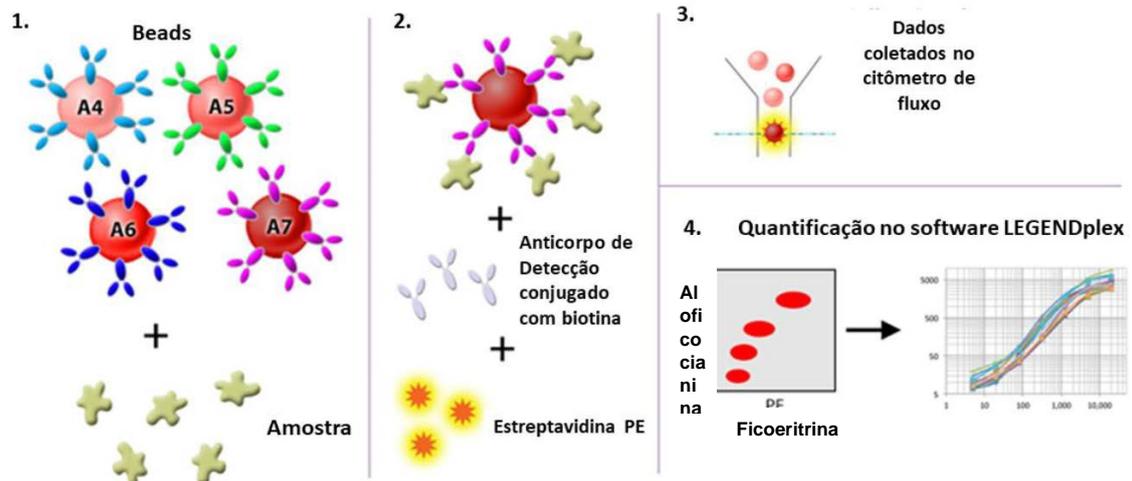
3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19)

A inflamação é um dos principais causadores do comprometimento funcional do EPR, levando ao surgimento de inúmeras doenças oftalmológicas, uma vez que esse epitélio desempenha várias funções metabólicas e de apoio na retina sensorial (CARDIN, 2013). Dessa forma, para a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* dos lupanos, as células ARPE-19 foram estimuladas com LPS, um composto biológico pró-inflamatório, utilizado para avaliar a resposta inflamatória em diferentes células e modelos animais. Diversos estudos que investigaram novos candidatos a fármaco para uso ocular utilizaram o estímulo com LPS em células ARPE-19, simulando condições retiniais observadas em uveíte, retinopatia diabética e degeneração macular relacionada à idade (CASTRO, 2020; GIROL *et al.*, 2013; MAUGERI *et al.*, 2018; OZAL *et al.*, 2018; PAIMELA *et al.*, 2007; ZHANG, J. *et al.*, 2019).

Nessa avaliação, foi utilizado o kit customizado de *beads* para citometria (LEGENDplex®). Esse ensaio consiste em uma plataforma multiplex utilizada para quantificar simultaneamente até 13 imunomarcadores envolvidos em diversos processos. O princípio da técnica é o mesmo aplicado em imunoenaios do tipo sanduíche, nos quais o analito solúvel é capturado entre dois anticorpos. As *beads* de captura se diferenciam por tamanho e intensidade de fluorescência interna e estão conjugadas aos anticorpos específicos para os analitos, por meio de reações

cruzadas de carbodiimida (LEHMANN *et al.*, 2019). O princípio da técnica está representado na figura 26.

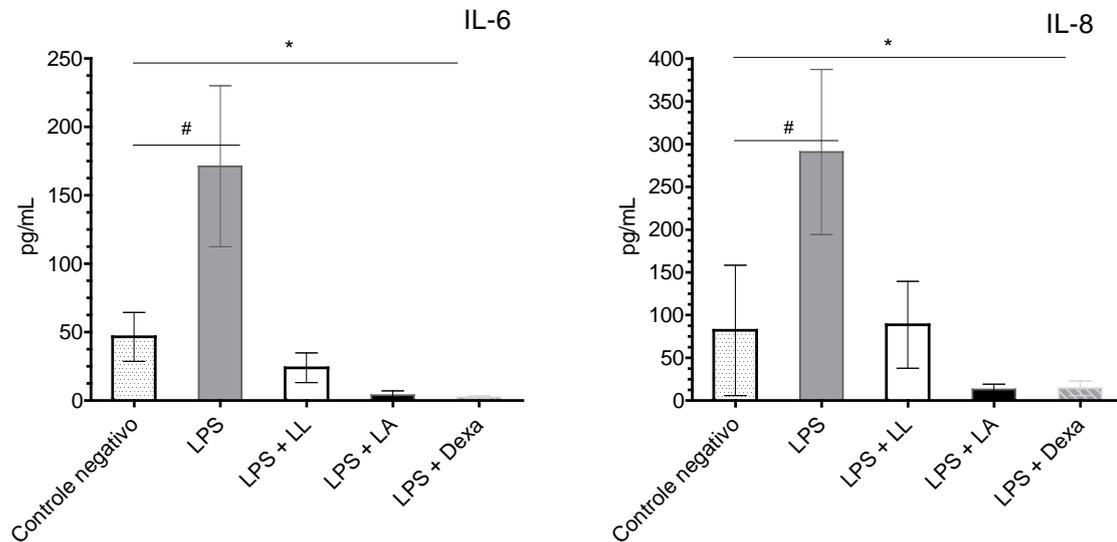
Figura 26: Esquema das principais etapas do ensaio LEGENDplex®



Fonte: CASTRO, 2020.

Com o emprego do ensaio LEGENDplex®, observou-se que o estímulo com LPS 10 µg/mL resultou em um aumento na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 pelas células ARPE-19, quando comparadas ao controle negativo, conforme demonstrado na figura 27.

Figura 27: Efeito do tratamento prévio com LL e LA na produção de citocinas (IL-6 e IL-8) pelas células ARPE-19 estimuladas com LPS.



***Diferença significativa do controle positivo, que recebeu apenas LPS 10 µg/mL. # Diferença significativa do controle negativo que recebeu somente meio de cultura; valor de $p < 0,05$.**

Outros estudos também observaram um aumento na produção de IL-6 e IL-8 nas células ARPE-19 após estímulo com LPS e esse efeito foi atribuído à ativação das vias de sinalização de MAPK e NF- κ B (SONG *et al.*, 2020; ZHANG, J. *et al.*, 2019).

Jung e colaboradores (2014) demonstraram que a ativação de ERK e NF- κ B é necessária para induzir a expressão dos genes de IL-6, MCP-1 (quimiotática de monócitos-1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) nas células ARPE-19. A análise proteômica da linhagem celular ARPE-19 estimuladas com LPS também identificou eventos de fosforilação em proteínas associadas a ativação das vias do NF- κ B e das MAPKs, as quais estão envolvidas na secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e IL-8 (SONG *et al.*, 2020).

A IL-6 é uma citocina inflamatória aguda envolvida no recrutamento de células polimorfonucleares, enquanto a IL-8 (CXCL8) é uma quimiocina associada à atração e ativação de neutrófilos e eosinófilos (ARJAMAA *et al.*, 2017; HWA PAENG *et al.*, 2015). Além disso, a IL-8 está envolvida no processo de migração e adesão de células T, monócitos e basófilos ao endotélio vascular, com consequente extravasamento dessas células nos tecidos (ARJAMAA *et al.*, 2017; ELNER *et al.*,

2005). As citocinas IL-6 e IL-8 estão também envolvidas no processo de angiogênese, podendo estar associadas à neovascularização observada na DMRI e retinopatia diabética (ARJAMAA *et al.*, 2017). Ainda, a toxicidade nas células ARPE-19 associada ao estímulo com LPS é mediada pela IL-6 e IL-8, por meio de um loop autócrino, tempo-dependente (ZHANG, J. *et al.*, 2019).

O tratamento com LA e LL (100 µmol/L) diminuiu de forma significativa os níveis de ambas as citocinas no sobrenadante em comparação com as células ativadas com LPS não tratadas. Achados semelhantes foram observados em outras linhagens celulares tratadas com LL e foram associados ao seu efeito na sinalização de NF-κβ (LEE *et al.*, 2016; OLIVEIRA-JUNIOR *et al.*, 2019). Em relação à LA, esse foi o primeiro estudo que observou sua ação *in vitro* sobre a produção das citocinas IL-6 e IL-8.

Além disso, ressalta-se que a redução nos níveis das citocinas IL-6 e IL-8 promovida pelos lupanos foi semelhante à detectada em células ARPE-19 tratadas com dexametasona, um esteroide utilizado no tratamento da inflamação ocular (SAINCHER; GOTTLIEB, 2020). Não foi verificada nenhuma diferença significativa nos níveis de IL-6 e IL-8 dos grupos tratados com LL, LA e dexametasona, que apresentaram valores estatisticamente semelhantes ao controle negativo.

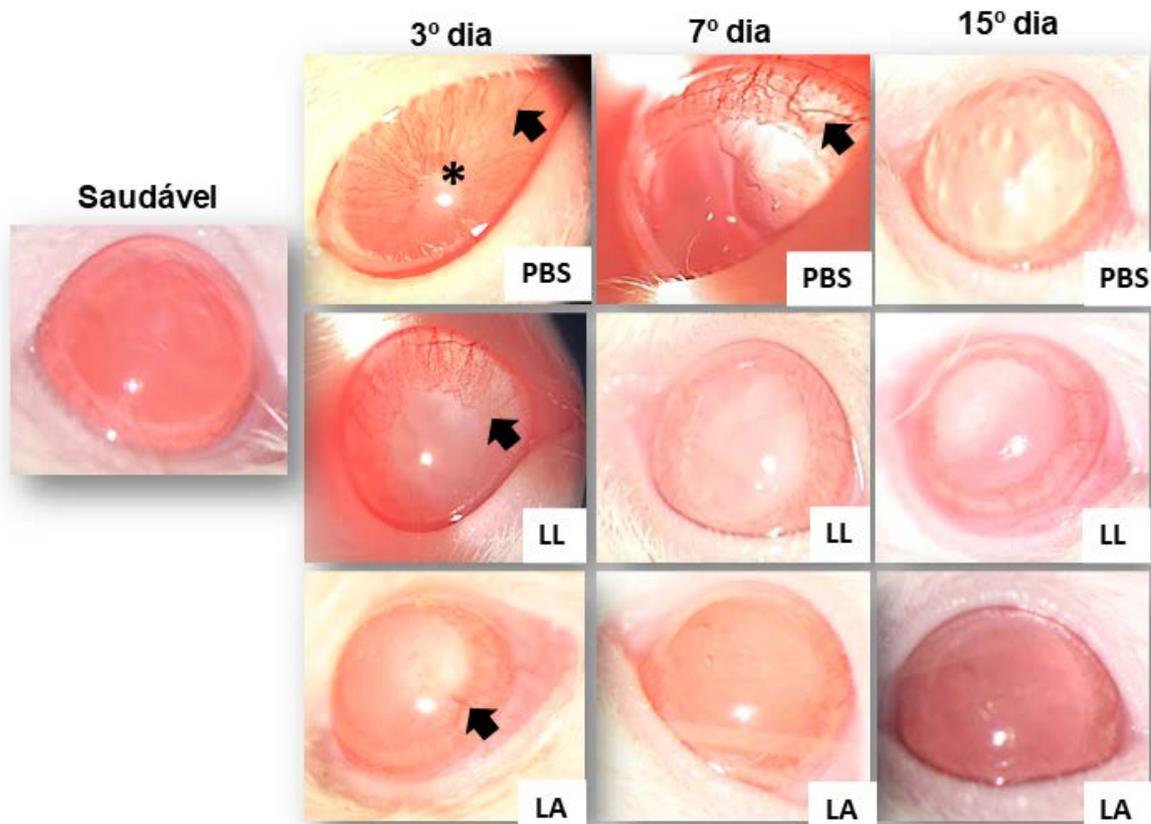
Dessa forma, os efeitos benéficos observados com o tratamento prévio com LL e LA indicam o potencial desses triterpenos no tratamento de doenças inflamatórias oculares e, portanto, estimularam a investigação terapêutica *in vivo*.

3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos lupanos em modelo experimental de uveíte induzida por BCG em ratos

3.2.1 Avaliação clínica

As imagens representativas para cada grupo avaliado, obtidas por meio da lâmpada de fenda, estão dispostas na figura 28. Sinais da uveíte, como fotofobia, miose, congestão dos vasos íris e *flare* na câmara anterior foram detectados nos olhos de todos os animais avaliados, no 3º dia após a indução da uveíte. Ressalta-se que, no grupo que recebeu apenas veículo, a congestão dos vasos da íris foi mais intensa do que no grupo que recebeu tratamento com lupanos.

Figura 28: Imagens representativas da câmara anterior dos olhos dos animais nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.

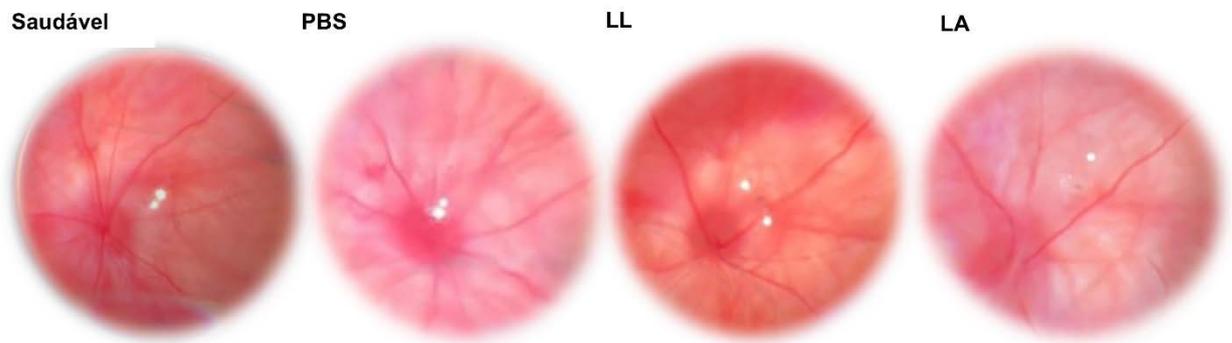


O asterisco indica a formação de membrana de fibrina e oclusão pupilar; a seta indica a congestão de vasos na íris.

Além disso, observou-se, no 3º dia, a oclusão pupilar e formação de membrana de fibrina nos animais que receberam apenas o tampão PBS (indicado pela seta na figura 23). Nos 7º e 15º dias, foram notados sinais mais brandos de inflamação.

O segmento posterior do bulbo ocular também foi avaliado. Em todos os olhos com uveíte, notou-se a presença de opacidade (*haze*) vítrea. Sendo tal achado mais intenso no 3º dia e menos frequente no 15º dia. Imagens representativas do fundo do olho dos animais no 15º dia estão demonstradas na figura 29.

Figura 29: Imagens representativas do fundo de olho dos animais 15 dias após a indução da uveíte.

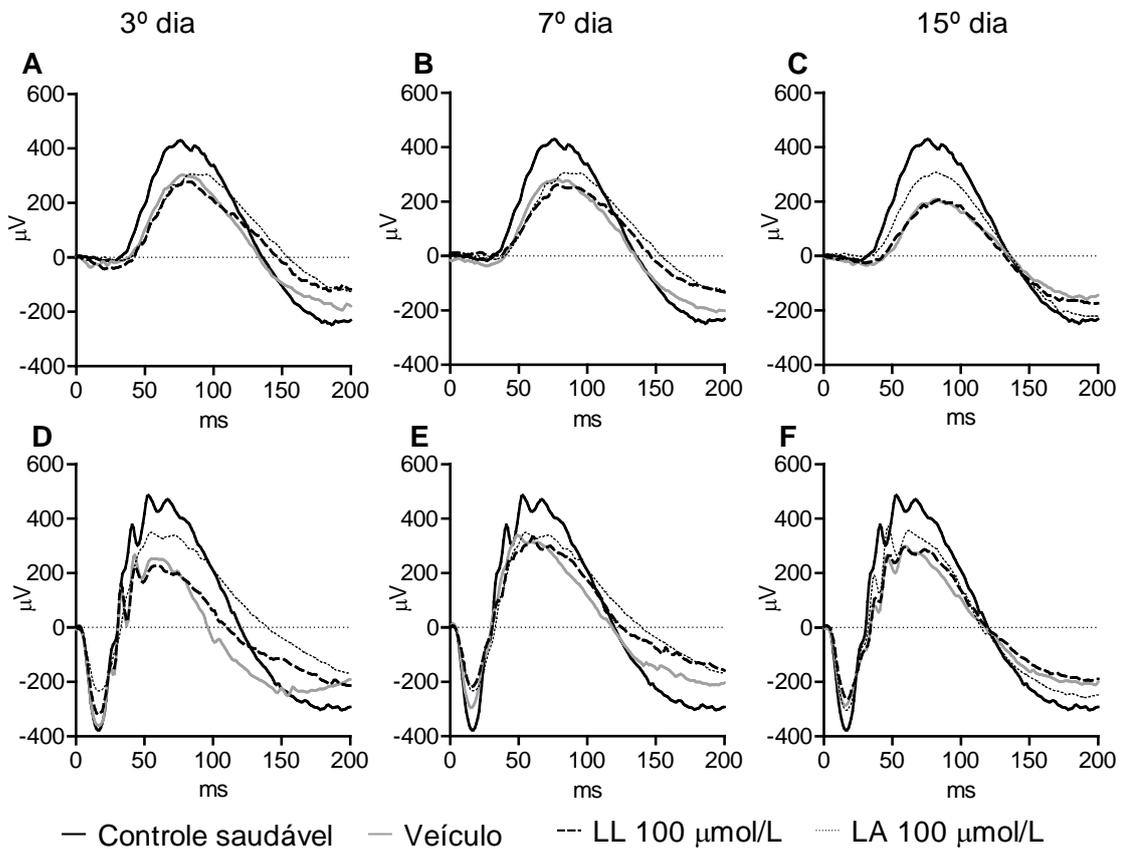


Notou-se uma discreta hiperemia do disco óptico nos animais que receberam PBS. Já nos olhos que receberam tratamento de LL e LA, não foram detectadas alterações do disco óptico. Ressalta-se ainda que, em nenhum dos grupos, foram observados sinais de descolamento e/ou hemorragia de retina.

3.2.2 Avaliação eletrorretinográfica

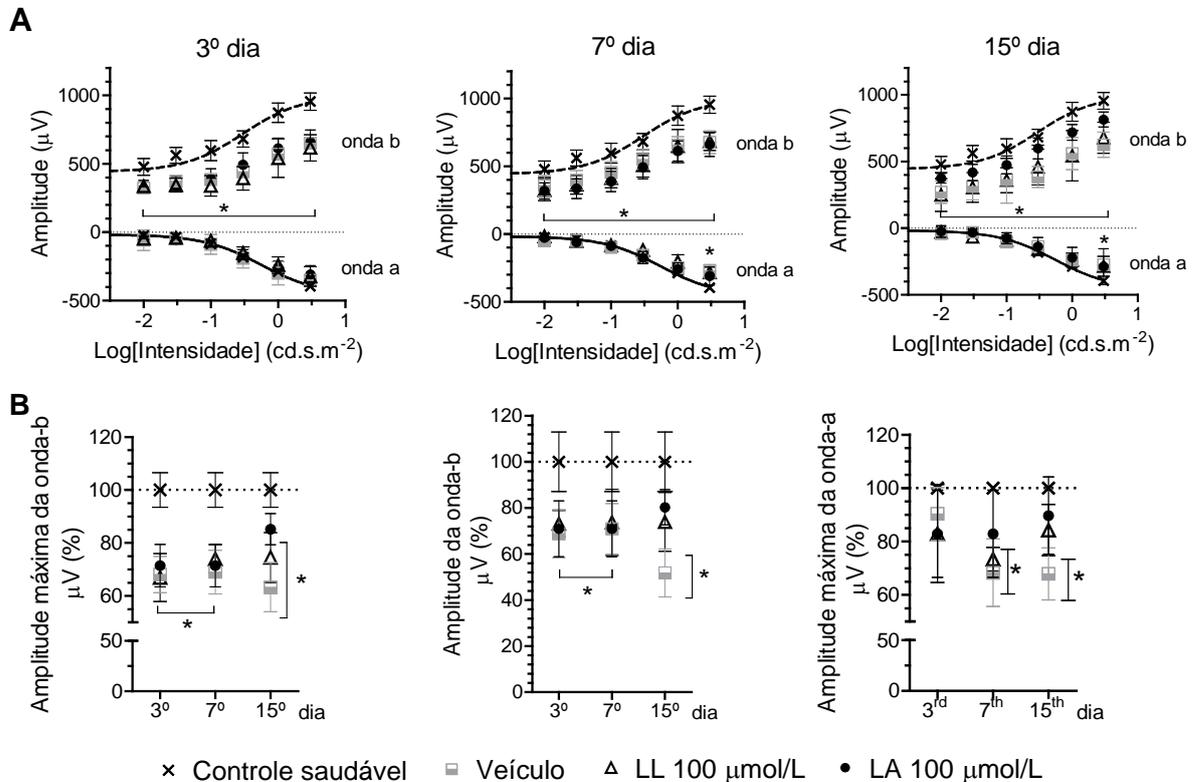
O ERG foi utilizado para avaliar os potenciais danos à retina decorrentes do processo inflamatório, assim como a progressão destes após os tratamentos com os lupanos. Muitos estudos têm utilizado o ERG para monitorar a disfunção da retina associada à uveíte experimental (CASTRO *et al.*, 2020; PAIVA; VASCONCELOS-SANTOS; *et al.*, 2021; SANDE *et al.*, 2008). A figura 30 apresenta o perfil representativo das respostas escotópicas às intensidades luminosas de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ obtidas nos períodos predeterminados. As curvas foram comparadas àquelas dos olhos saudáveis.

Figura 30: Perfil eletrorretinográfico nas condições escotópica - $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (A - C) e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (D - F) nos tempos 3, 7 e 15 dias após indução da uveíte.



Em concordância com dados da literatura, foi observada uma alteração do perfil eletrorretinográfico dos olhos que desenvolveram a uveíte (BARCIA *et al.*, 2009; BROUWER *et al.*, 2019; PAIVA; VASCONCELOS-SANTOS; *et al.*, 2021). Para melhor compreender as alterações observadas, os componentes do ERG foram avaliados de forma isolada. Primeiro, avaliou-se as amplitudes das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa (figura 31).

Figura 31: Amplitudes das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.



*Diferença significativa do grupo controle saudável; valor-p <0.05.

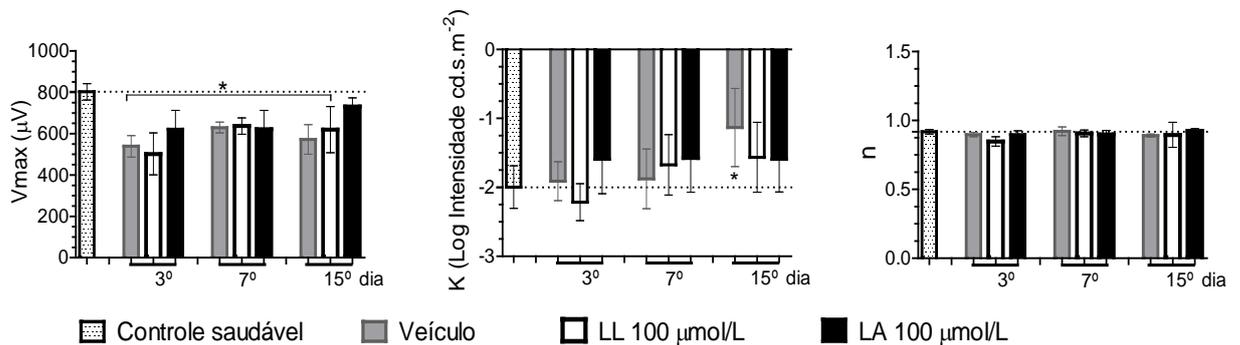
Observou-se que, no 3º dia após a indução da uveíte, as amplitudes das ondas a dos olhos inflamados não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos olhos saudáveis. No entanto, nos dias 7 e 15, no grupo tratado com veículo, houve uma diminuição na amplitude da onda a, em resposta aos estímulos de luz mais elevados (3 cd.s.m^{-2}), sugerindo uma lesão nos fotorreceptores (Figura 31 B). Para o grupo tratado com LL, essa diferença estatística foi observada apenas no 7º dia, o que indica que o dano aos fotorreceptores foi transitório. Já para o grupo que recebeu o LA, não foram detectadas alterações estatísticas na amplitude da onda a durante todo o período avaliado.

Já a amplitude da onda b, reduziu em todos os grupos com uveíte, sendo mais grave no grupo que não recebeu tratamento. Inclusive, ressalta-se que a redução da amplitude da onda b no grupo que recebeu apenas o veículo foi gradativa, ou seja, no 15º dia, a amplitude da onda havia reduzido cerca de 36%

(figura 31 B). Enquanto nos grupos que receberam o tratamento com os lupanos, observou-se um comportamento inverso, ou seja, a redução da amplitude da onda foi mais intensa no 3º dia, atenuando-se com o passar dos dias. Acredita-se que a piora dos animais que receberam apenas veículo possa ser sugestiva de que o BCG tenha provocado sequelas graves e/ou permanentes na camada nuclear interna e, portanto, às células bipolares. Tais alterações foram amenizadas por meio do tratamento prévio com os lupanos LL e LA (SANDE *et al.*, 2008).

Em seguida, a relação entre a amplitude da onda b e o logaritmo da intensidade luminosa foi analisada segundo a equação de Naka-Rushton, descrita no capítulo I, item 3.3.1, pág. 63. A figura 32 apresenta os parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton em diferentes tempos.

Figura 32: Parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton (V_{max} , K, n) nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.



*Diferença significativa do grupo controle saudável; valor-p <0.05.

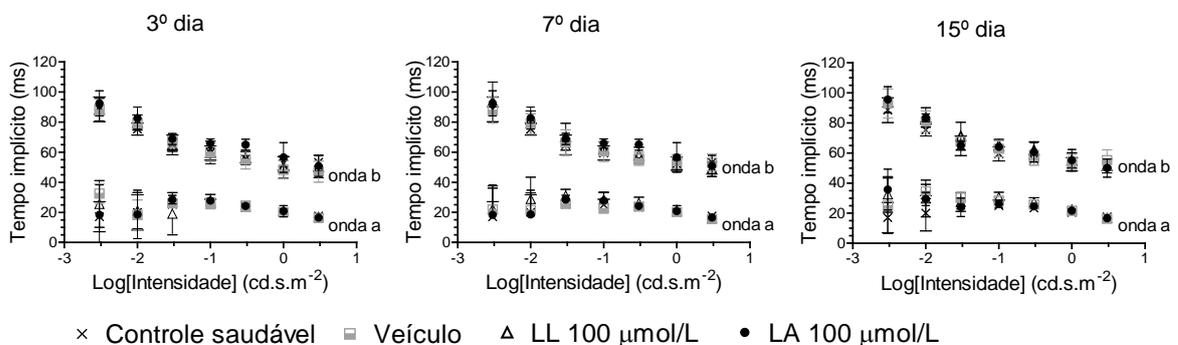
De acordo com a análise estatística, foi detectado que a amplitude máxima registrada (V_{max}) de todos os olhos com uveíte foi menor do que olhos saudáveis e não houve diferença entre o grupo tratado e não tratado nos dias 3 e 7. Há hipóteses de que reduções nesse parâmetro estão relacionadas à danos funcionais ou perda de fotorreceptores, disfunções da retina interna, compressão da resposta neural ou desvio do potencial elétrico (JOHNSON *et al.*, 2019). Já no 15º dia, notou-se que os olhos que receberam o tratamento prévio com o LA apresentaram uma recuperação do parâmetro $V_{máx}$, indicando que a amplitude saturada da onda b era semelhante à

dos olhos saudáveis. Tais achados não foram observados nos olhos que receberam veículo ou LL.

Em relação ao parâmetro K, no 15^o dia, foi observada uma variação de cerca de 45% no grupo tratado apenas com veículo, sugerindo que uma intensidade maior é necessária para atingir 50% de V_{max} . A variação (aumento) do parâmetro K foi evitada nos grupos tratados com LL ou LA, o que indica que os lupanos podem ser capazes de evitar danos relacionados ao tempo causados pelo BCG sob as células fotorreceptoras ou à transmissão sináptica entre estas e as células bipolares. Já em relação ao parâmetro n, não foram observadas diferenças estatísticas entre os olhos saudáveis e doentes.

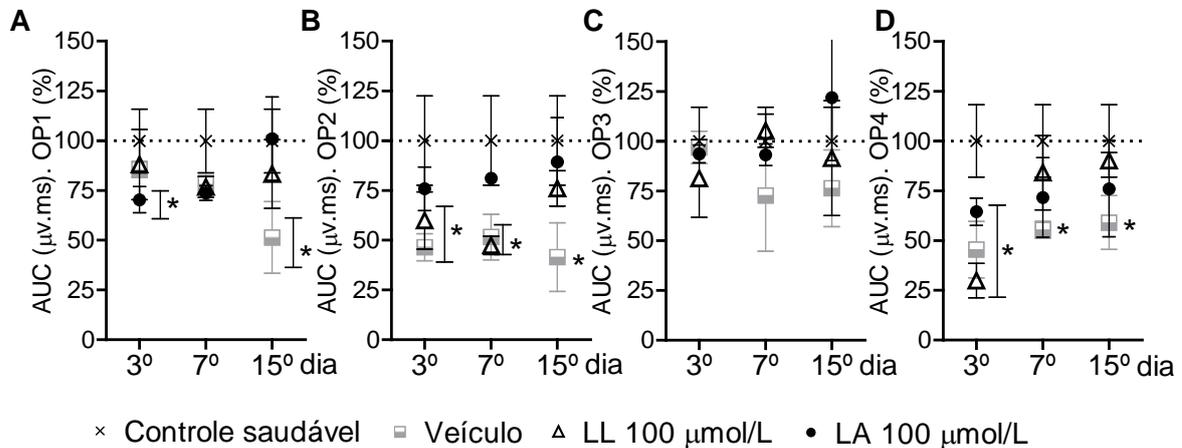
Durante o exame escotópico, alterações no tempo implícito das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa também foram avaliadas e não foram observadas variações significativas (figura 33).

Figura 33: Tempo implícito das ondas a e b em função do logaritmo da intensidade luminosa nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.



Além disso, os 4 OPs gerados durante os exames escotópicos sob a intensidade luminosa de 3,00 cd.s.m⁻² foram analisados (figura 34), de acordo com a metodologia descrita no capítulo I item 2.3.1, pág. 65.

Figura 34: Área sob a curva dos OPs, em condição escotópica e intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m⁻².

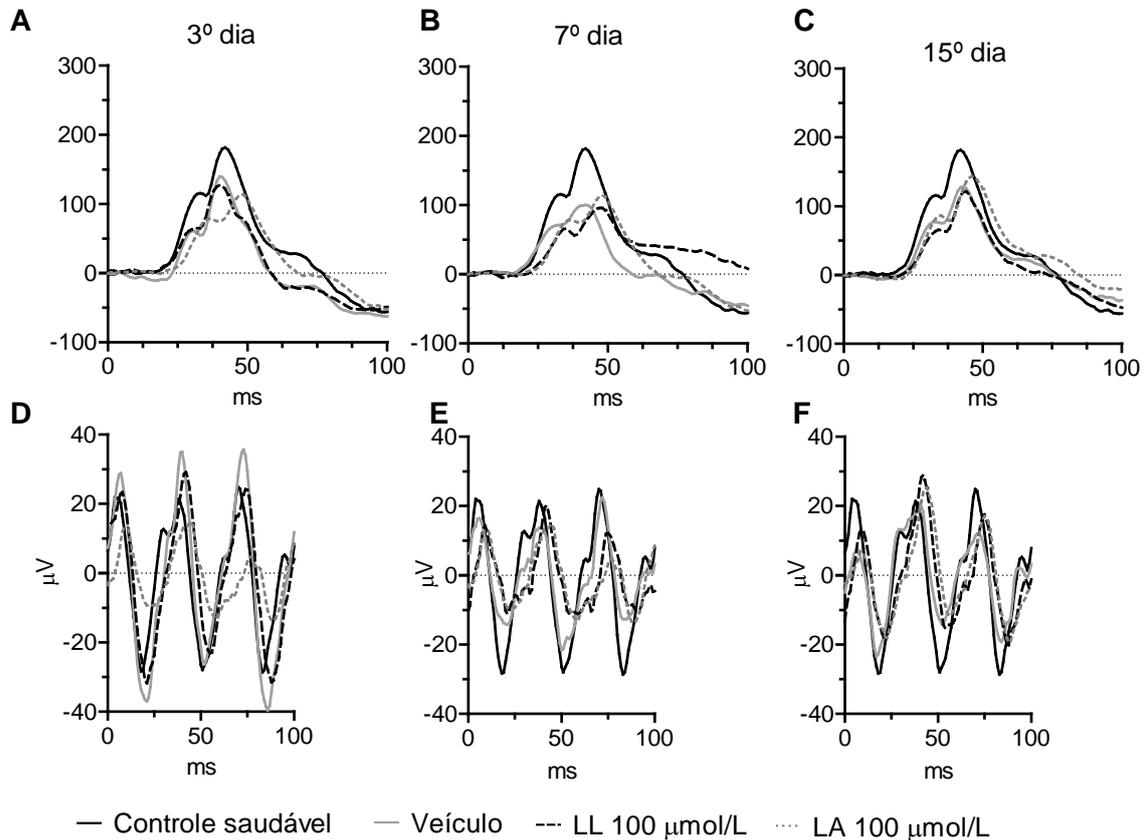


***Diferença significativa do grupo controle saudável; valor-p <0.05.**

Em concordância com a deterioração das estruturas da retina, já detectadas pelas avaliações das amplitudes da onda b, houve, também, uma diminuição da AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{ms}$) dos OPs, sendo essa redução mais grave e progressiva no grupo que não recebeu tratamento. Nos grupos que receberam tratamento com lupanos, pode-se observar que a variação dos OPs foi mais intensa no 3º dia da avaliação eletrorretinográfica, tornando-se próxima à do grupo saudável com o passar dos dias, sugerindo que o tratamento com os lupanos foi capaz de amenizar os efeitos danosos da uveíte (ZHAO *et al.*, 2016).

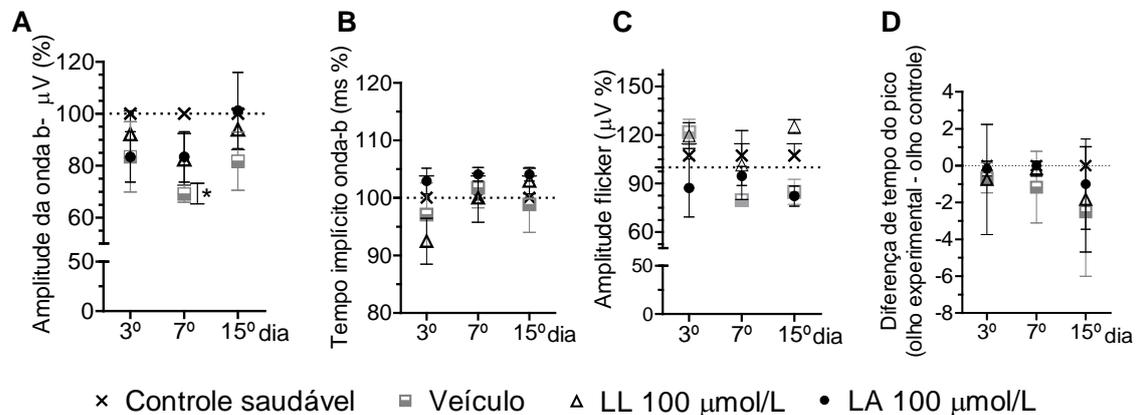
Após o exame escotópico, prosseguiu-se com a avaliação dos registros em condições fotópicas sob intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m⁻² e flicker de 30 Hz. Conforme ilustrado na figura 35 e, em concordância com o exame escotópico, observou-se uma alteração (redução) do perfil eletrorretinográfico dos olhos inflamados, quando comparados aos olhos saudáveis.

Figura 35: Perfil eletrorretinográfico da resposta fotópica na intensidade luminosa de 3,0 cd.s.m⁻² (A - C) e flicker de 30 Hz (D - F) nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.



Avaliou-se a amplitude e o tempo implícito da onda b em resposta à intensidade luminosa de 3,00 cd.s.m⁻² (figura 36 A-B) e a amplitude e diferença no tempo do pico mediante *flicker* de 30 Hz (figura 36 C-D). Observou-se apenas uma alteração significativa na amplitude da onda b no grupo veículo, no 7^o dia, indicando danos transitórios aos cones. Para o *flicker* (figura 36 C e D), não foram verificadas quaisquer alterações na amplitude e na diferença de tempo de pico. De acordo com Brouwer e colaboradores (2020), o atraso no tempo implícito da onda b de cones é uma das alterações características no ERG de pacientes com uveíte. Entretanto, devido à escassez de cones em roedores, tal parâmetro é pouco utilizado em estudos pré-clínicos (CHEN *et al.*, 2013).

Figura 36: Variações percentuais da amplitude e tempo implícito médio da onda b em condições fotópicas com luminância de 3,0 cd.s.m⁻² (A e B) e mediante flicker de 30 Hz (C e D) nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.



*Diferença significativa do grupo controle saudável; valor-p <0.05.

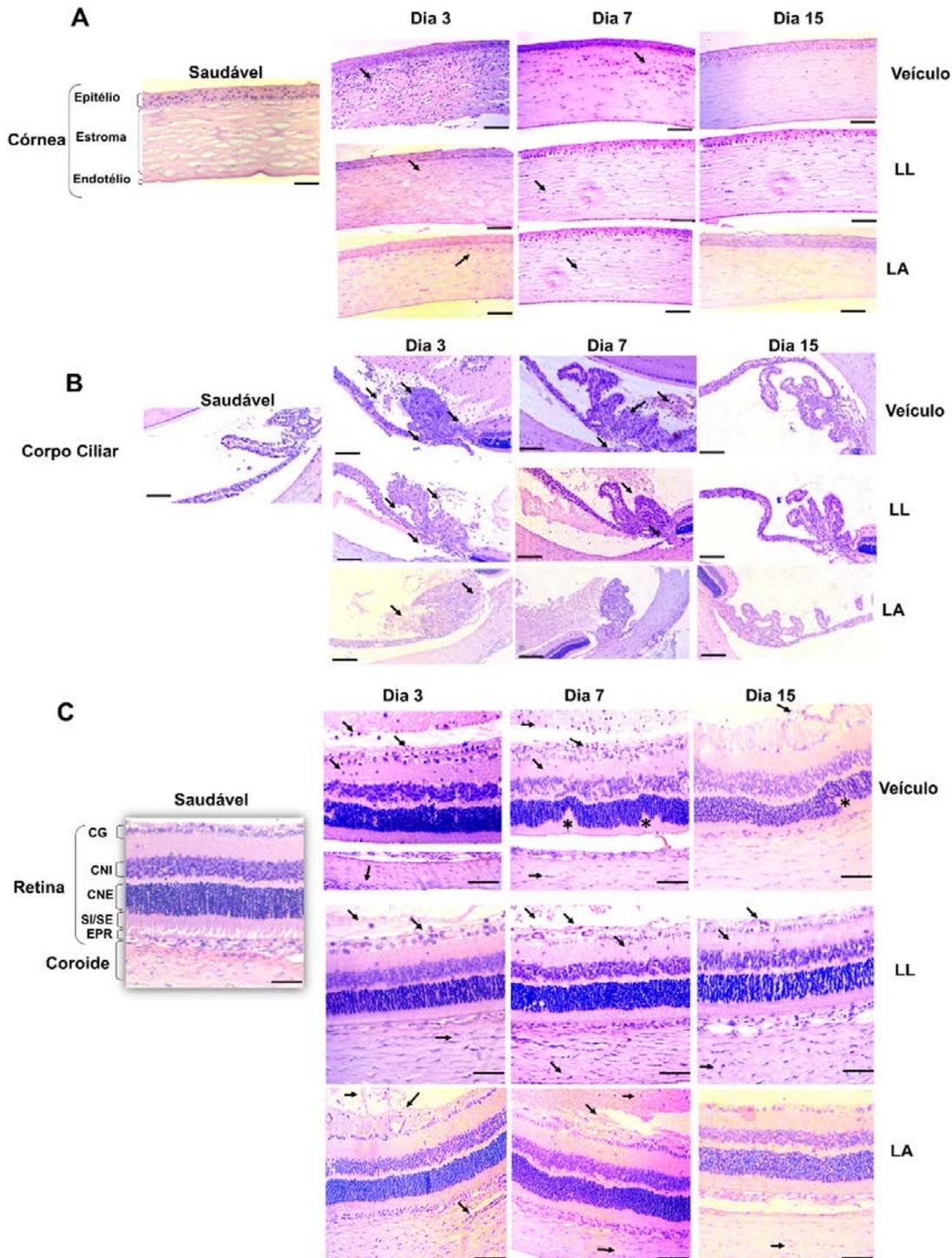
Dessa forma, de acordo com as análises de ERG realizadas, pode-se inferir que a indução da uveíte pelo BCG causou alterações funcionais na retina dos animais, sendo tais disfunções prevenidas e/ou resgatadas por meio do tratamento prévio com os lupoanos LL e LA.

3.2.3 Avaliação histológica

A figura 37 demonstra as alterações histológicas induzidas pela uveíte no segmento anterior (córnea), corpo ciliar, retina e coroide. Todas as imagens foram comparadas com olhos saudáveis.

No 3º dia após a indução da uveíte, observou-se uma infiltração significativa de células inflamatórias na córnea, corpo ciliar, cavidade vítrea, retina e coroide nos olhos do grupo que recebeu apenas veículo. Em uma fase posterior (7 e 15 dias pós-injeção de BCG), pode-se notar que menos células inflamatórias estavam presentes infiltrando esses tecidos. No entanto, detectou-se algum grau de anfractuosidade da retina, caracterizada pela formação de dobras na camada do segmento externo dos fotorreceptores (SE) para dentro da camada nuclear externa (CNE).

Figura 37: Fotomicrografias representativas das principais estruturas (córnea, corpo ciliar, retina e coróide) afetadas pelo processo inflamatório obtidas nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.



Setas pretas indicam a presença de células inflamatórias; os asteriscos exibem a dobra interna do segmento externo dos fotorreceptores para a camada nuclear externa.

Abreviaturas: CG: camada de células ganglionares; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa; SI / SE: segmento interno e segmento externo de fotorreceptores; EPR: epitélio pigmentado da retina. Barra de escala = 100 μm .

Para os grupos que receberam tratamento com os lupanos, verificou-se que o processo inflamatório foi mais brando, quando comparado ao grupo que recebeu apenas veículo; houve relevante redução do infiltrado inflamatório no segmento anterior, corpo ciliar, vítreo e retina. Além disso, durante o período avaliado, não foi constatada nenhuma desordem estrutural das camadas da retina, sugerindo que LL e LA intravítreos podem exercer efeitos anti-inflamatórios em olhos de ratos com uveíte, sendo capazes de prevenir sequelas decorrentes desse processo patológico.

Faz-se necessário ressaltar que as mudanças morfológicas no SE de fotorreceptores e seus núcleos (localizados no CNE) no grupo veículo são consistentes com as reduções das amplitudes das ondas a, detectadas por meio do exame eletrorretinográfico. Porém, não foram observadas lesões na camada nuclear interna, que está relacionada à onda b do ERG. Para melhor investigar este parâmetro, novos estudos devem ser conduzidos, a fim de avaliar as alterações ultraestruturais nas camadas retinianas e se a presença de células inflamatórias e mediadores podem interferir na transdução do sinal visual, independente do dano físico real (CHEN *et al.*, 2013).

3.2.4 Avaliação indireta da presença de macrófagos e neutrófilos

Respostas inflamatórias envolvem o recrutamento de células polimorfonucleares (PMN) e monócitos/macrófagos (OGUIDO *et al.*, 2017), que por sua vez, promovem a secreção de fatores pró-inflamatórios. Esses fatores levam ao aumento da permeabilidade vascular da BHR, culminando com a infiltração de células inflamatórias, tanto no segmento anterior quanto posterior do olho, podendo promover danos às células nervosas (KLAASSEN *et al.*, 2013).

O MPO é uma proteína do grupo heme, encontrada em grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e em monócitos (em menor nível). Essa enzima é responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso e halogenetos em ácidos hipoalergênicos, levando à formação de intermediários reativos, que por sua vez contribuem para a peroxidação lipídica (GIOVANNINI *et al.*, 2010; SILVA, C. N. *et al.*, 2019). O doseamento de MPO tem sido amplamente utilizado como marcador para medir acúmulo de PMNs em amostras de tecidos.

Já o NAG, que está presente, em altos níveis, em macrófagos ativados, têm sido empregados como marcador para detectar o acúmulo/ativação de macrófagos

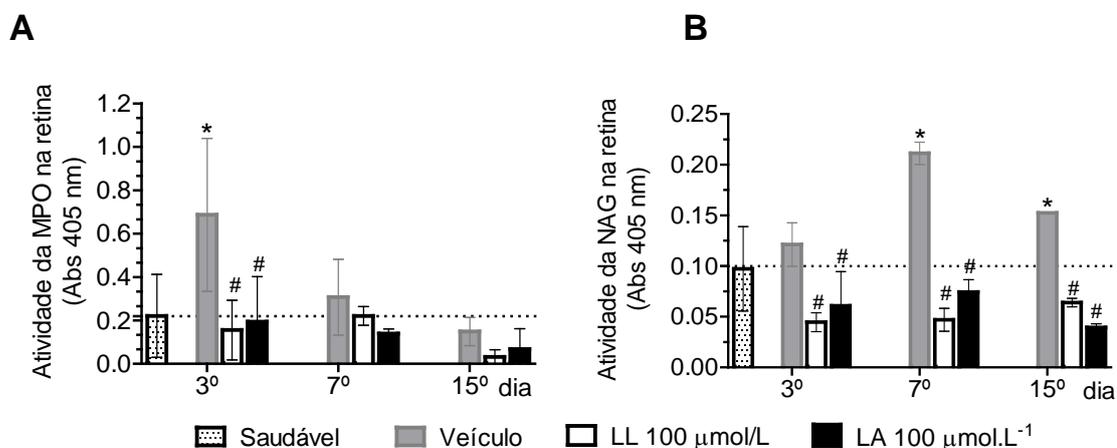
em tecidos. Dessa forma, a partir do doseamento de MPO e NAG, foi possível avaliar o infiltrado inflamatório nos olhos dos animais que desenvolveram a uveíte (SILVA, R. O. *et al.*, 2019).

Conforme ilustrado na figura 38, pode-se observar que no 3º dia após a indução da uveíte, houve um aumento significativo da atividade do MPO no grupo que recebeu apenas o veículo, o que pode indicar a ocorrência de um recrutamento maciço de neutrófilos da circulação sistêmica para o compartimento intraocular, associado ao aumento da permeabilidade da barreira hemato-ocular. Ressalta-se que essa infiltração leva à produção de citocinas e quimiocinas, que são capazes de promover a interação leucócito-endotélio, liberando espécies reativas de oxigênio e danificando o tecido ocular (SETTIMIO *et al.*, 2012). Dessa forma, a inibição do tráfego de neutrófilos para o olho pode atenuar a resposta inflamatória intraocular, e isso foi observado por meio do tratamento intravítreo com os lupanos.

O mesmo efeito na atividade de MPO foi observado ao usar LL em outros tecidos inflamados (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; KASINATHAN; SUBRAMANIYA; SIVASITHAMPARAM, 2018).

Assim como os neutrófilos, a ativação de macrófagos também promove a liberação de diferentes produtos tóxicos e geração de proteínas sinalizadoras (citocinas e quimiocinas), levando ao estresse oxidativo e, portanto, a danos teciduais (MÉRIDA *et al.*, 2015). De acordo com os resultados apresentados pela figura 38, os lupanos intravítreos também foram capazes de reduzir a ativação / infiltração de macrófagos no segmento posterior dos olhos inflamados, durante todo o período avaliado.

Figura 38: Avaliação da infiltração de neutrófilos e macrófagos na retina nos tempos 3, 7 e 15 dias após a indução da uveíte.



* Diferença significativa do grupo saudável, valor-p <0,01.

Diferença significativa do grupo que recebeu apenas veículo, valor-p <0,001.

A capacidade do LL em evitar o rompimento da integridade epitelial mediada por macrófagos já foi relatada por Zhu e colaboradores (2016) que, ainda, descrevem que tal bloqueio esteja associado à inibição da via de p38 MAPK. Dessa forma, combinando-se os resultados do estudo *in vitro* à literatura disponível, sugere-se que os benefícios da administração intravítrea do LL no olho inflamado possam estar associados à inibição das vias de sinalização mediadas por NF- κ B e MAPKs. Ressalta-se que outros estudos devem ser conduzidos para confirmar esta hipótese.

Quanto à LA, esse foi o primeiro estudo que demonstrou a capacidade desse lupano em reduzir os níveis das enzimas (MPO e NAG) associadas à caracterização do infiltrado inflamatório. Análises de predição molecular sugerem que a LA exerça um papel nas vias de sinalização mediadas por MAPKs e NF- κ B. Além disso, Lee e colaboradores (2020) demonstraram que a LA é capaz de atenuar a degradação e a fosforilação da subunidade I κ B α em células neuronais e inibir a translocação de NF- κ B para o núcleo. Dessa forma, sugere-se a necessidade de realização de estudos para melhor caracterizar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste cenário.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados desse capítulo, pode-se sugerir que os lupanos LA e LL (100 $\mu\text{mol/L}$) foram capazes de modular a inflamação, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. Por meio do ensaio *in vitro*, foi demonstrado que os lupanos reduziram os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 liberadas pelas células do epitélio pigmentado da retina humana (ARPE-19), em resposta à estimulação pelo LPS, sendo essa diminuição comparável ao grupo que recebeu tratamento com o padrão dexametasona. E com o emprego do modelo experimental de uveíte induzido por BCG em ratos, observou-se que os lupanos atenuaram a gravidade da inflamação, tanto nos segmentos anteriores quanto posteriores dos olhos, o que foi confirmado por meio das análises clínica, eletrorretinográfica, histopatológica e imunológica. Dessa forma, pode-se inferir que a administração intravítrea de lupanos LA e LL 100 $\mu\text{mol/L}$ apresenta-se como uma terapia promissora para o manejo da uveíte.

5 PERSPECTIVAS

O conhecimento sobre a segurança e o potencial antiangiogênico e anti-inflamatório dos triterpenos LA e LL na terapêutica oftálmica, estimula a realização de estudos adicionais, a fim de melhor caracterizar quais são as vias de sinalização envolvidas nesse processo, investigar quais metabólitos são liberados nos tecidos oculares, bem como definir quais são as doses de maior potencial terapêutico. Aliado a isso, o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada contendo os triterpenos para administração ocular, facilitaria a administração destes, melhoraria a biodisponibilidade e poderia trazer mais conforto para pacientes em estudos clínicos futuros.

6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

✓ Artigos científicos relacionadas à tese

TOLEDO, C.R.; PEREIRA, V.V.; DUARTE, L.P.; SOUSA, G.F.; SILVA-CUNHA, A. Anti-angiogenic activity and safety of intraocular application of triterpenes. *Documenta Ophthalmologica*, 2021.

TOLEDO, C. R.; PAIVA, M. R. B.; CASTRO, B.F.M.; PEREIRA, V.V.; CENACHI, S.P.F.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FIALHO, S.L; SILVA-CUNHA, A. Intravitreal lupeol: a new potential therapeutic strategy for noninfectious uveitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021.

✓ Artigos científicos não relacionadas à tese

DOURADO, L. F.N.; OLIVEIRA, L.G.; SILVA, C.N; TOLEDO, C.R.; FIALHO, S.L.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A. Intravitreal ketamine promotes neuroprotection in rat eyes after experimental ischemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 133, p. 110948, 2021.

CARDOSO, J.F; PERASOLI, F.B; ALMEIDA, T.C.; MARQUES, M.B.F; TOLEDO, C.R.; GIL, P.O; TAVARES, H.S.; DA PAZ, M.C.; MUSSEL, W.N.; MAGALHÃES, J.T.; SILVA, G.N.; SILVA-CUNHA, A.; GRANJEIRO, P.A.; KLIBANOV, A. M.; SILVA, G.R. Vancomycin-loaded N,N-dodecyl,methyl-polyethylenimine nanoparticles coated with hyaluronic acid to treat bacterial endophthalmitis: Development, characterization, and ocular biocompatibility. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 169, p. 330-341, 2021.

TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V.V.; ANDRADE, G. F.; SILVA-CUNHA, A. PLGA-corosolic acid implants for potential application in ocular neovascularization diseases. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences (Online)*, v. 56, p. e18484, 2020.

DOURADO, L.F.N; SILVA, F.R; TOLEDO, C.R.; SILVA, C.N.; SANTANA, C.P.; COSTA, B.L.; LIMA, M.E.; CUNHA JUNIOR, A. Intravitreal injection of peptides

PnPa11 and PnPa13, derivatives of *Phoneutria nigriventer* spider venom, prevents retinal damage. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 26, p. e20200031, 2020.

TOLEDO, C.R. ; PEREIRA, V.V.; DOURADO, L.F.N; PAIVA, M. R. B.; CUNHA JUNIOR, A . Corosolic acid: antiangiogenic activity and safety of intravitreal injection in rats eyes. *Documenta Ophthalmologica*, v. 138, n. 3, p. 181–194, 2019.

✓ **Trabalhos apresentados em eventos científicos relacionados à tese**

TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V.V.; SOUSA, G. F.; DUARTE, L. P.; SILVA-CUNHA, A. Avaliação da segurança da utilização oftálmica do lupeol. V Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas.2020.

TOLEDO, C. R.; PAIVA, M. R. B.; CASTRO, B.F.M.; PEREIRA, V.V.; CENACHI, S.P.F.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FIALHO, S.L; SILVA-CUNHA, A. Lupeol: a potential intravitreal drug for uveitis. 13th International Congress of Pharmaceutical Sciences- CIFARP. 2021.

✓ **Trabalhos apresentados em eventos científicos não relacionados à tese**

TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V.V.; DOURADO, L. F. N.; PAIVA, M. R. B.; SILVA-CUNHA, A. Ácido corosólico: atividade antiangiogênica e segurança da administração intravítrea em olhos de ratos. Prêmio Pio Corrêa.2021.

DOURADO, L.F.N.; OLIVEIRA, L.G.; SILVA, C.N.; TOLEDO, C.R.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S.L. Injeção intravítrea de cetamina atenua degeneração retiniana induzida por processo isquêmico. V Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas.2020.

OLIVEIRA, L.G.; DOURADO, L.F.N.; SILVA, C.N; TOLEDO, C.R.; CUNHA, A.S. Avaliação de toxicidade da ketamina em membrana corioalantóica. III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR. 2018.

DOURADO, L.F.N.; TOLEDO, C.R.; BORGES, P.S.; SILVA-CUNHA, A. Light toxicological investigation: development and evaluation of an alternative method. IV Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2018.

TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V.V.; DOURADO, L. F. N.; PAIVA, M. R. B.; SILVA-CUNHA, A. Ophthalmic application and evaluation of corosolic acid toxicity. IV Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2018.

✓ **Patentes não relacionadas à tese**

TOLEDO, C. R.; SILVA-CUNHA, A. ; SILVA, C. N. ; SANTANA, C. ; RODRIGUES, F. S. ; DOURADO, L. F. N. ; LIMA, M. E. ; COMAR, M. ; MAGALHAES, N. ; DONATO, M. F. Peptídeos sintéticos neuroprotetores e analgésicos, formulações farmacêuticas e usos. 2018, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR1020180750356, título: "Peptídeos sintéticos neuroprotetores e analgésicos, formulações farmacêuticas e usos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 03/12/2018. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de São João Del-Rei, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

TOLEDO, C. R.; SILVA-CUNHA, A. ; LIMA, M. E. ; DOURADO, L. F. N. ; RODRIGUES, F. S. ; SILVA, C. N. ; SANTANA, C. ; EMERICH, B. ; COSTA, B. L. ; DUARTE, I. D. G. ; DONATO, M. F. ; PIMENTA, A. M. C. Peptídeos sintéticos neuroprotetores e analgésicos, formulações farmacêuticas e usos. 2018, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR1020180750615, título: "Peptídeos sintéticos neuroprotetores e analgésicos, formulações farmacêuticas e usos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 03/12/2018. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- AAO – American Academy of Ophthalmology. **What is uveitis?** Disponível em: <https://www.aao.org/eye-health/diseases/what-is-uveitis>. Acesso em: 06 abr. 2022.
- ADAMIS, A. P. *et al.* Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology*, v. 113, n. 1, p. 23–28, 2006.
- AGARWAL, M. *et al.* Drug-induced uveitis: a review. *Indian Journal of Ophthalmology*, v. 68, n. 9, p. 1799–1807, 2020.
- AIRODY, A. *et al.* Non-Infectious Uveitis: Optimising the Therapeutic Response. *Drugs*, v. 76, n. 1, p. 27–39, 2016.
- AKAGAWA, M. *et al.* Methylglyoxal impairs β 2 -adrenoceptor-mediated vasodilatory mechanisms in rat retinal arterioles. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 41, n. 2, p. 272–276, 2018.
- ALMEIDA, F. P. P. *et al.* In vivo release and retinal toxicity of cyclosporine-loaded intravitreal device. *Documenta Ophthalmologica*, v. 131, n. 3, p. 207–214, 2015.
- ALVARADO, H. L. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 983–984, p. 111–116, 2015.
- AMER, R.; NALCI, H.; YALÇINDAĞ, N. Exudative retinal detachment. *Survey of Ophthalmology*, v. 62, n. 6, p. 723–769, 2017.
- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. in mouse and rat models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n. 8, p. 1070–1077, 2011.
- ARJAMAA, O. *et al.* Hypoxia and inflammation in the release of VEGF and interleukins from human retinal pigment epithelial cells. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 255, n. 9, p. 1757–1762, 2017.
- ASHA, R.; GAYATHRI DEVI, V.; ABRAHAM, A. Lupeol, a pentacyclic triterpenoid isolated from *Vernonia cinerea* attenuate selenite induced cataract formation in Sprague Dawley rat pups. *Chemico-Biological Interactions*, v. 245, p. 20–29, 2016.
- AUERBACH, R. *et al.* A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Developmental Biology*, v. 41, n. 2, p. 391–394, 1974.
- BADSHAH, H. *et al.* Protective effect of lupeol against lipopolysaccharide-induced neuroinflammation via the p38/c-Jun N-terminal kinase pathway in the adult mouse brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 11, n. 1, p. 48–60, 2016.

BARCIA, E. *et al.* Downregulation of endotoxin-induced uveitis by intravitreal injection of poly(lactic-glycolic acid) (PLGA) microspheres loaded with dexamethasone. *Experimental Eye Research*, v. 89, n. 2, p. 238–245, 2009.

BEDNARCZYK-CWYNARA, B.; WIĘCASZEK, T.; RUSZKOWSKI, P. NPC Natural Product Communications. *Natural Product Communications*, v. 11, n. 9, p. 1237–1238, 2016.

BENCHORIN, G. *et al.* Assessment of Murine Retinal Function by Electroretinography. *Bio-protocol*, v. 7, n. 7, p. 1–11, 2017.

BERTRAND, P. J. *et al.* Uveitis: autoimmunity... and beyond. *Autoimmunity Reviews*, v. 18, n. 9, p. 102351, 2019.

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

BROUWER, A. H. *et al.* Prolonged Cone b-Wave on Electroretinography Is Associated with Severity of Inflammation in Noninfectious Uveitis. *American Journal of Ophthalmology*, v. 207, p. 121–129, 2019.

BRUTON, L. L.; CHABNER, B.A. ; KNOLLMANN, B.C. [org]. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. 2079p.

CARLSON, B. M. *Special Senses—Vision and Hearing*. [S.l: s.n.], 2019.

CASTRO, B. F. M. *A melitina no tratamento de uveítes : avaliação da segurança e atividade anti-inflamatória a melitina no tratamento de uveítes : avaliação da segurança e atividade anti-inflamatória*. 2020. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

CASTRO, B. F. M. *et al.* Intravitreal thalidomide ameliorates inflammation in a model of experimental uveitis induced by BCG. *International Immunopharmacology*, v. 81, n. December 2019, p. 106129, 2020.

CHEN, J. *et al.* Use of optical coherence tomography and electroretinography to evaluate retinal pathology in a mouse model of autoimmune uveitis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. e63904, 2013.

CHENG, Z. *et al.* A derivative of betulinic acid protects human Retinal Pigment Epithelial (RPE) cells from cobalt chloride-induced acute hypoxic stress. *Experimental Eye Research*, v. 180, n. September 2018, p. 92–101, 2019.

CHENG, Z. *et al.* The potential application of pentacyclic triterpenoids in the prevention and treatment of retinal diseases. *Planta Medica*, v. 87, n. 07, p. 511–527, 2021.

CLARCK, M. E.; KRAFT, T. W. Measuring Rodent Electroretinograms to Assess

Retinal Function. *Methods Molecular Biology*, v. 884, p. 265–286, 2012.

COSTANZO, L. S. *Physiology*, Fifth Edition, LWW, S.l: s.n., 2014.

DELPLACE, V.; PAYNE, S.; SHOICHET, M. Delivery strategies for treatment of age-related ocular diseases: From a biological understanding to biomaterial solutions. *Journal of Controlled Release*, v. 219, p. 652–668, 2015.

DESCHENES, J. *et al.* International Uveitis Study Group (IUSG): clinical classification of uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation*, v. 16, n. 1–2, p. 1–2, 2008.

DONG, C. J.; AGEY, P.; HARE, W. A. Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. *Visual Neuroscience*, v. 21, n. 4, p. 533–543, 2004.

DOURADO, L. F. N. *Efeito neuroprotetor de peptídeos derivados da aranha armadeira (Phoneutria nigriventer) em doenças da retina*. 2021. 196 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

DOURADO, L. F. N. *et al.* Intravitreal injection of peptides PnPa11 and PnPa13, derivatives of Phoneutria nigriventer spider venom, prevents retinal damage. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 26, n. September 2020, p. 1–16, 2020.

DUPLECHAIN A, *et al.* Uveitis. [Atualizado 2021 Nov 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540993/>. Acesso em: 06 de abril de 2022.

DUNN, J. P. Uveitis. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, v. 42, n. 3, p. 305–323, 2015.

EGOSHI, C. T. *et al.* QUANTIFICATION OF TUMOR-INDUCED ANGIOGENESIS ON CHICKEN EMBRYO CHORIOALLANTOIC MEMBRANE. *Bioscience Journal*, v. 31, n. 1, p. 303–310, 2015.

ELNER, S. G. *et al.* TLR4 mediates human retinal pigment epithelial endotoxin binding and cytokine expression. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 46, n. 12, p. 4627–4633, 2005.

FERNÁNDEZ, M. A. *et al.* New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, n. 11, p. 1533–1539, 2001.

FORRESTER, J. V. *et al.* Anatomy of the eye and orbit. *The Eye*, p. 1- 102.e2, 2016.

FOSTER, C. S. *et al.* The ocular immunology and uveitis foundation preferred practice patterns of uveitis management. *Survey of Ophthalmology*, v. 61, n. 1, p. 1–17, 2016.

- FUKUNAGA, H. *et al.* Analysis of inflammatory mediators in the vitreous humor of eyes with pan-uveitis according to aetiological classification. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 2783, 2020.
- GALLEGO-PINAZO, R. *et al.* Update on the Principles and Novel Local and Systemic Therapies for the Treatment of Non-Infectious Uveitis. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 12, p. 38–45, 2013.
- GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Actividade biológica do lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 1, p. 46–66, 2009.
- GIOVANNINI, S. *et al.* Myeloperoxidase levels and mortality in frail community-living elderly individuals. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 65 A, n. 4, p. 369–376, 2010.
- GIROL, A. P. *et al.* Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 11, p. 5689–5701, 2013.
- GONZALEZ FERNANDEZ, D. *et al.* Uveitis in São Paulo, Brazil: 1053 New Patients in 15 Months. *Ocular Immunology and Inflammation*, v. 00, n. 0, p. 1–6, 2016.
- GUYTON, A.C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 7.ed. São Paulo: Elsevier, 2011.
- HAMMOUM, I. *et al.* Retinal dysfunction parallels morphologic alterations and precede clinically detectable vascular alterations in Meriones shawi, a model of type 2 diabetes. *Experimental Eye Research*, v. 176, n. June, p. 174–187, 2018.
- HASSAN, M. *et al.* New therapies in development for the management of non-infectious uveitis: A review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 47, n. 3, p. 396–417, 2019.
- HUANG, D.; CHEN, Y.-S.; RUPENTHAL, I. D. Overcoming ocular drug delivery barriers through the use of physical forces. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017.
- HUANG, W. *et al.* Application of electroretinography (ERG) in early drug development for assessing retinal toxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 289, n. 3, p. 525–533, 2015.
- HULSART-BILLSTRÖM, G. *et al.* A surprisingly poor correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: Results of a multicentre analysis. *European Cells and Materials*, v. 31, p. 312–322, 2016.
- HWA PAENG, S. *et al.* YCG063 inhibits *Pseudomonas aeruginosa* LPS-induced inflammation in human retinal pigment epithelial cells through the TLR2-mediated AKT/NF- κ B pathway and ROS-independent pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 36, n. 3, p. 808–816, 2015.

JABS, D. A. *et al.* Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the first international workshop. *American Journal of Ophthalmology*, v. 140, n. 3, p. 509–516, 2005.

JHANJI, V.; RAPUANO, C. J.; VAJPAYEE, R. B. Corneal calcific band keratopathy. *Current Opinion in Ophthalmology*, v. 22, n. 4, p. 283–289, 2011.

JOHNSON, M. A. *et al.* ISCEV extended protocol for the stimulus–response series for the dark-adapted full-field ERG b-wave. *Documenta Ophthalmologica*, v. 6, p. 217–227, 2019.

JUNG, W. K. *et al.* The 15-deoxy-d12,14-prostaglandin J2 inhibits LPS-stimulated inflammation via enhancement of the platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human retinal pigment epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 33, n. 2, p. 449–456, 2014.

KASINATHAN, N. K.; SUBRAMANIYA, B.; SIVASITHAMPARAM, N. D. NF- κ B/twist mediated regulation of colonic inflammation by lupeol in abating dextran sodium sulfate induced colitis in mice. *Journal of Functional Foods*, v. 41, p. 240–249, 2018.

KIM, Y. C. *et al.* Ocular delivery of macromolecules. *Journal of Controlled Release*, v. 190, p. 172–181, 2014.

KIZAWA, J. *et al.* Changes of Oscillatory Potentials and Photopic Negative Response in Patients with Early Diabetic Retinopathy. *Japanese Journal of Ophthalmology*, v. 50, p. 367–373, 2006.

KLAASSEN, I.; NOORDEN, C. J. F. VAN; SCHLINGEMANN, R. O. Progress in Retinal and Eye Research Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. Progress in Retinal and Eye Research, v. 34, p. 19–48, 2013.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. BERNE & LEVY Fisiologia. Ed. Elsevier. 2009. 6^a ed. Pg. 679.

KUE, C. S. *et al.* Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Esperimental Animals*, v. 64, n. 2, p. 129–138, 2015.

KUETE, V. *et al.* In vitro cytotoxicity of compounds isolated from *Desbordesia glaucescens* against human carcinoma cell lines. *South African Journal of Botany*, v. 111, p. 37–43, 2017.

LEE, C. *et al.* Lupeol inhibits LPS-induced NF- κ B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates acute and chronic murine colitis. *Life Sciences*, v. 146, p. 100–108, 2016.

LEHMANN, J. S. *et al.* LEGENDplexTM: Bead-assisted multiplex cytokine profiling by flow cytometry. 1. ed. [S.I.]: Elsevier Inc., 2019. v. 629.

LIN, P. Infectious Uveitis. *Current Ophthalmology Reports*, v. 3, n. 3, p. 170–183, 2015.

LIN, P.; SUHLER, E. B.; ROSENBAUM, J. T. The future of uveitis treatment. *Ophthalmology*, v. 121, n. 1, p. 365–376, 2014.

LLOYD, A. W.; FARAGHER, R. G. A.; DENYER, S. P. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials*, v. 22, p. 769–785, 2001.

LOFTSSON, T. *et al.* Topical drug delivery to the posterior segment of the eye: anatomical and physiological considerations. *Pharmazie*, v. 63, n. 3, p. 171–179, 2008.

MALINOWSKA, M. *et al.* New lupeol esters as active substances in the treatment of skin damage. *PLoS ONE*, v. 14, n. 3, p. 1–15, 2019.

MAGALHÃES, C. G. *et al.* *Maytenus salicifolia* Reissek, Celastraceae: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, p. 415–419, 2011.

MANNA, S. *et al.* Noninvasive electroretinography assessment of intravitreal sustained-release methotrexate microimplants in rabbit eyes. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 32, n. 9, p. 583–594, 2016.

MARTÍNEZ-SOLÍS, I. *et al.* Neuroprotective potential of Ginkgo biloba in retinal diseases. *Planta Medica*, v. 85, p. 1292–1303, 2019.

MARTINI, L. H. *et al.* Naturally occurring compounds affect glutamatergic neurotransmission in rat brain. *Neurochemical Research*, v. 32, n. 11, p. 1950–1956, 2007.

MARTUCCIELLO, S. *et al.* Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. *Chemico-Biological Interactions*, v. 183, n. 3, p. 450–454, 2010.

MAUGERI, A. *et al.* Resveratrol modulates SIRT1 and DNMT functions and restores LINE-1 methylation levels in ARPE-19 cells under oxidative stress and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 7, p. 1–14, 2018.

MCCULLOCH, D. L. *et al.* ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Documenta Ophthalmologica*, v. 130, n. 1, p. 1–12, 2015.

MÉRIDA, S. *et al.* Macrophages and uveitis in experimental animal models. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, p. 671417, 2015.

MUDUMBA, S. *et al.* Tolerability and pharmacokinetics of intravitreal sirolimus. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 28, n. 5, p. 507–514, 2012.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, S.; MARTIN-MOLA, E. Uveitis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 20, n. 3, p. 487–505, 2006.

NAZARUK, J.; BORZYM-KLUCZYK, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochemistry Reviews*, p. 675–690, 2014.

NEGRETTO, A. D. *et al.* Avaliação da retinopatia hipertensiva através do potencial oscilatório do eletroretinograma. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 71, n. 1, p. 38–42, 2008.

NGUYEN, C. T. *et al.* Simultaneous Recording of Electroretinography and Visual Evoked Potentials in Anesthetized Rats. *Journal of Visualized Experiments*, n. 113, p. e54158–e54158, 2016.

NGUYEN, Q. D. *et al.* Intravitreal sirolimus for noninfectious uveitis: a phase III sirolimus study assessing double-masked uveitis treatment (SAKURA). *Ophthalmology*, v. 123, n. 11, p. 2413–2423, 2016.

NGUYEN, Q. D. *et al.* Ocular tolerability and efficacy of intravitreal and subconjunctival injections of sirolimus in patients with non-infectious uveitis: Primary 6-month results of the SAVE Study. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2013.

OGUIDO, A. P. M. T. *et al.* Naringenin eye drops inhibit corneal neovascularization by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 58, n. 13, p. 5764–5776, 2017.

OH, H. N. *et al.* Effects of Quercetin in a Mouse Model of Experimental Dry Eye. *Cornea*, v. 34, n. 9, p. 1130–1136, 2015.

OLIVEIRA-JUNIOR, M. S. *et al.* Lupeol inhibits LPS-induced neuroinflammation in cerebellar cultures and induces neuroprotection associated to the modulation of astrocyte response and expression of neurotrophic and inflammatory factors. *International Immunopharmacology*, v. 70, n. November 2018, p. 302–312, 2019.

ORMAECHEA, M. S. *et al.* Safety of systemic therapy for noninfectious uveitis. *Expert Opinion on Drug Safety*, v. 18, n. 12, p. 1219–1235, 2019.

OZAL, S. A. *et al.* Esculetin protects human retinal pigment epithelial cells from lipopolysaccharide-induced inflammation and cell death. *Current Eye Research*, v. 43, n. 9, p. 1169–1176, 2018.

PAIMELA, T. *et al.* The effect of 17 β -estradiol on IL-6 secretion and NF- κ B DNA-binding activity in human retinal pigment epithelial cells. *Immunology Letters*, v. 110, n. 2, p. 139–144, 2007.

PAIVA, M. R. B. *Desenvolvimento de implantes intravítreos contendo sirolimus visando o tratamento de uveíte autoimune*. 2015. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

PAIVA, M. R. B. *Avaliação da segurança e atividade de implante intravítreo contendo*

sirolimus em modelo de uveíte autoimune experimental. 2019. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

PAIVA, M. R. B.; ARRIBADA, R. G.; *et al.* Assessment of the safety of intravitreal injection of metoprolol tartrate in rabbits. *Documenta Ophthalmologica*, v. 142, n. 1, p. 75–85, 2021.

PAIVA, M. R. B.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; *et al.* Licarin A as a novel drug for inflammatory eye diseases. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 37, n. 5, p. 290–300, 2021.

PAIVA, M. R. B. *et al.* Toxicity and in vivo release profile of sirolimus from implants into the vitreous of rabbits' eyes. *Documenta Ophthalmologica*, v. 138, n. 1, p. 3–19, 2019.

PATRIDGE, E. *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

PESCOSOLIDO, N. *et al.* Curcumin: Therapeutical potential in ophthalmology. *Planta Medica*, v. 80, n. 4, p. 249–254, 2014.

PRETE, M. *et al.* Autoimmune uveitis: clinical, pathogenetic, and therapeutic features. *Clinical and Experimental Medicine*, v. 16, n. 2, p. 125–136, 2016.

QUEIROZ, J. M.; QUEIROZ JUNIOR, J. M.; QUEIROZ, F. J. C. Degeneração macular relacionada à idade: Considerações histopatológicas. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 69, n. 6, p. 400–406, 2010.

ROBSON, A. G. *et al.* ISCEV guide to visual electrodiagnostic procedures. *Documenta Ophthalmologica*, v. 136, p. 1–26, 2018.

ROSENBAUM, J. T. *et al.* New observations and emerging ideas in diagnosis and management of non-infectious uveitis: a review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 49, n. 3, p. 438–445, 2019.

ROTHOV, A. *et al.* Uveitis masquerade syndromes. *Evidence-Based Eye Care*, v. 2, n. 3, p. 168–169, 2001.

SAINCHER, S. S.; GOTTLIEB, C. Ozurdex (dexamethasone intravitreal implant) for the treatment of intermediate, posterior, and panuveitis: a systematic review of the current evidence. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

SANDE, P. H. *et al.* Therapeutic effect of melatonin in experimental uveitis. *The American Journal of Pathology*, v. 173, n. 6, p. 1702–1713, 2008.

SETTIMIO, R. *et al.* Resolvin D1 reduces the immunoinflammatory response of the rat eye following uveitis. *Mediators of Inflammation*, v. 2012, p. 318621, 2012.

SHARMA, N. *et al.* Corneal edema after phacoemulsification. *Indian Journal of Ophthalmology*, v. 65, p. 1381–9, 2017.

SHEN; LU, J. G. W.; HUGHES, P. Target ocular drug delivery with pharmacokinetic / pharmacodynamic considerations. *Pharm Res*, v. 35, n. 217, 2018.

SILVA, C. N. DA *et al.* A new topical eye drop containing lyetxi-b, a synthetic peptide designed from a lycosa erithrognata venom toxin, was effective to treat resistant bacterial keratitis. *Toxins*, v. 11, n. 4, 2019.

SILVA, F. R. *et al.* Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposomes: A new treatment strategy for corneal healing. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 130, n. June, p. 110391, 2020.

SILVA, F. R. *et al.* Intravitreal injection of the synthetic peptide LyeTx I b , derived from a spider toxin , into the rabbit eye is safe and prevents neovascularization in a chorio- allantoic membrane model. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 24, n. 31, p. 1–13, 2018.

SILVA, R. O. *et al.* Treatment for chemical burning using liquid crystalline nanoparticles as an ophthalmic delivery system for pirfenidone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 568, n. June, p. 118466, 2019.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SMET, M. D. *et al.* Understanding uveitis: the impact of research on visual outcomes. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 30, n. 6, p. 452–470, 2011.

SOARES, D. C. F. *et al.* Antiangiogenic activity of PLGA-lupeol implants for potential intravitreal applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 92, p. 394–402, 2017.

SONG, J. *et al.* Comprehensive proteomic and phosphoproteomic analysis of retinal pigment epithelium reveals multiple pathway alterations in response to the inflammatory stimuli. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 9, p. 3037, 2020.

SOUSA, G. F. *et al.* Pentacyclic triterpenes from branches of *Maytenus robusta* and in vitro cytotoxic property against 4T1 cancer cells. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 8, p. 1338–1345, 2014.

SOUSA, G.F. Estudo fitoquímico e atividade biológica de constituintes das folhas e galhos de *maytenus robusta* (celastraceae).2016. 250f. Tese (Doutorado em Ciências- Química) - Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

SOUSA, G. F. D. *et al.* Anti-inflammatory, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of friedelanones from *Maytenus robusta* branches and isolation of further triterpenoids. *Phytochemistry Letters*, v. 21, n. May, p. 61–65, 2017.

SOUZA, M. C. M. *et al.* Tacrolimus-Loaded PLGA Implants: In Vivo Release and

Ocular Toxicity. *Current Eye Research*, v. 39, n. 1, p. 99–102, 2014.

TAYLOR, A. W. Ocular immune privilege. *Eye*, v. 23, n. 10, p. 1885–1889, 2009.

TOLEDO, C. R. *Ácido corosólico na oftalmologia: avaliação da atividade antiangiogênica, segurança e toxicidade ocular, desenvolvimento e caracterização de implante biodegradável de liberação prolongada*. 2018. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V. V.; *et al.* Anti-angiogenic activity and safety of intraocular application of triterpenes. *Documenta Ophthalmologica*, 2021.

TOLEDO, C. R. *et al.* Corosolic acid: antiangiogenic activity and safety of intravitreal injection in rats eyes. *Documenta Ophthalmologica*, v. 138, n. 3, p. 181–194, 2019.

TOLEDO, C. R.; PAIVA, M. R. B.; *et al.* Intravitreal lupeol: A new potential therapeutic strategy for noninfectious uveitis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 143, 2021.

TOLEDO, C. R. *et al.* PLGA-corosolic acid implants for potential application in ocular neovascularization diseases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 56, p. e18484, 2020.

TOTH, C. A.; SEIDER, M. I.; CHEN, X. Intravitreal triamcinolone deposition mimicking frosted branch angiitis : optical coherence tomography findings. *Retina, The Journal of Retinal and Vitreous Diseases*, v. 36, p. 41–42, 2016.

TOUHAMI, S. *et al.* Neoplasia and intraocular inflammation: from masquerade syndromes to immunotherapy-induced uveitis. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 72, n. November 2018, 2019.

TRIVEDI, A.; KATELARIS, C. The use of biologic agents in the management of uveitis. *Internal Medicine Journal*, v. 49, n. 11, p. 1352–1363, 2019.

VALENZUELA, R. A. *et al.* New Pharmacological Strategies for the Treatment of Non-Infectious Uveitis. A Minireview. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, n. May, p. 1–8, 2020.

VIEIRA, L. C. *et al.* Rosmarinic acid intravitreal implants : a new therapeutic approach for ocular neovascularization. *Planta Medica*, 2020.

XU, F. *et al.* Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 103, n. January, p. 198–203, 2018.

YIN, X. *et al.* Longdan Xiegan Decoction alleviates experimental autoimmune uveitis in rats by inhibiting Notch signaling pathway activation and Th17 cell differentiation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 136, p. 111291, 2021.

ZHANG, J. *et al.* Celastrol ameliorates inflammation in human retinal pigment

epithelial cells by suppressing NF- κ B signaling. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 35, n. 2, p. 116–123, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Incidence, prevalence, and risk factors of infectious uveitis and scleritis in the United States: a claims-based analysis. *PLoS ONE*, v. 15, n. 8, p. e0237995, 2020.

ZHAO, P. T. *et al.* Therapeutic effects of mesenchymal stem cells administered at later phase of recurrent experimental autoimmune uveitis. *International Journal of Ophthalmology*, v. 9, n. 10, p. 1381–1389, 2016.

ZHU, Y. *et al.* The pentacyclic triterpene lupeol switches M1 macrophages to M2 and ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology*, v. 30, p. 74–84, 2016.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado de aprovação CEUA 300/2018



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 300/2018

Título do projeto: Avaliação da atividade e segurança da utilização de triterpenos no tratamento de doenças oftálmicas.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Armando da Silva Cunha Junior

Unidade: Faculdade de Farmacia

Departamento: Departamento de Produtos Farmaceuticos

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 01/10/2018. Validade: 01/10/2018 à 30/09/2023
Belo Horizonte, 01/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II – Certificado de aprovação CEUA 221/2019**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 221/2019**Título do projeto:** Avaliação da atividade anti-inflamatória dos triterpenos lupeol e lupenona em modelo de uveíte autoimune experimental.**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Armando da Silva Cunha Junior**Unidade:** Faculdade de Farmacia**Departamento:** Departamento de Produtos Farmaceuticos**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)Aprovado na reunião do dia 16/09/2019. Validade: 16/09/2019 à 15/09/2024
Belo Horizonte, 16/09/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO III – Certidões de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) para acesso e utilização de produtos naturais das espécies de *Maytenus*



**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 AEED846**

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: **AEED846**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica **Bioprospecção** **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Maytenus salicifolia
Maytenus salicifolia
Maytenus salicifolia
Helicobacter pylori
Trypanosoma cruzi

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Estudo fitoquímico e biológico da espécie Maytenus salicifolia**



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 A0B3BAC

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: **A0B3BAC**
Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica **Bioprospecção** **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Maytenus robusta

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de Maytenus robusta**

ANEXO IV – Publicação do Capítulo I no periódico *Documenta Ophthalmologica* (2021).

Doc Ophthalmol
<https://doi.org/10.1007/s10633-021-09841-z>



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Anti-angiogenic activity and safety of intraocular application of triterpenes

Cibele Rodrigues Toledo  · Vinicius Viana Pereira  · Lucienir Pains Duarte  · Grasiely Faria Sousa  · Armando Silva-Cunha 

Received: 15 December 2020 / Accepted: 12 May 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

ANEXO V – Publicação de parte do Capítulo II no periódico *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2021).

Biomedicine & Pharmacotherapy 143 (2021) 112145



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph



Intravitreal lupeol: A new potential therapeutic strategy for noninfectious uveitis



Cibele Rodrigues Toledo^a, Mayara Rodrigues Brandão Paiva^c,
Brenda Fernanda Moreira Castro^a, Vinicius Viana Pereira^a, Sarah Pereira de Freitas Cenachi^b,
Daniel Vítor Vasconcelos-Santos^b, Sílvia Ligório Fialho^{c,*}, Armando Silva-Cunha^{a,1}

^a Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Pharmaceutical Research and Development, Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ANEXO VI – Comprovante de realização de estágio doutoral no exterior financiado com a bolsa CAPES/Print (2020).



Ministério da Educação - MEC
Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 06
CEP 70.040-031 - Brasília, DF

CERTIDÃO DE EX-BOLSISTA

Declaramos, para os devidos fins, que o(a) Sr(a). CIBELE RODRIGUES TOLEDO, CPF 071.627.626-70, foi bolsista da Capes, na modalidade Doutorado Sanduiche no exterior, no âmbito do PRINT - PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INTERNACIONALIZAÇÃO, conforme dados abaixo:

Nº DO PROCESSO: 88887.370541/2019-00

TÍTULO DO PROJETO/TESE: Processo de Bolsa do Exterior para o beneficiário: 071.627.626-70 - CIBELE RODRIGUES TOLEDO - ci.toledo02@gmail.com

PERÍODO DA BOLSA: 12/2019 a 11/2020

INSTITUIÇÃO DE ESTUDO:

INSTITUT DE LA VISION - CENTRE DE RECHERCHE - França

As bolsas do PRINT - PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INTERNACIONALIZAÇÃO são isentas de imposto de renda de acordo com a legislação vigente (Lei nº 9.250, de 26 de dezembro de 1995, art. 26; Decreto nº 3.000, de 26 de março de 1999 - Regulamento do Imposto sobre a Renda (RIR/1999), art. 39, inciso VII; Instrução Normativa SRF nº 15, de 2001, art. 5º, inciso XVII), não caracterizando vínculo empregatício e não cabendo recolhimento de contribuição previdenciária.

Atenciosamente,

Idelazil Cristina do Nascimento Talhavini
Coordenador (a) Geral de Acompanhamento e Monitoramento de Resultados - Substituto (a)
Esta assinatura independe de reconhecimento de firma, por se tratar de documento público
- Art. 19, Inciso II - Constituição Federal do Brasil