UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Escola Paulista de Medicina

ROGIL JOSÉ DE ALMEIDA TORRES

AVALIAÇÃO DAS ANORMALIDADES PRECOCES ESCLEROCORIORRETINIANAS OBSERVADAS EM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS COM ROSIGLITAZONA

São Paulo

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ROGIL JOSÉ DE ALMEIDA TORRES

AVALIAÇÃO DAS ANORMALIDADES PRECOCES ESCLEROCORIORRETINIANAS OBSERVADAS EM COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS COM ROSIGLITAZONA

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências Visuais.

Orientadora: Profª. Drª. Cristina Muccioli.

Coorientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma.

São Paulo

Torres, Rogil José de Almeida Torres
Avaliação das anormalidades precoces esclerocoriorretinianas observadas em coelhos hipercolesterolêmicos tratados com Rosiglitazona /Rogil José de Almeida Torres. -São Paulo, 2010.
xxii. 125f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medícina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Visão.

Título em inglês: Evalution os Early sclerochorioretinal abnormalities in hypercholesterolemic rabbits treated with Rosiglitazone.

1.Aterosclerose. 2. Degeneração macular relacionada à idade. 3. Colesterol. 4. Esclera/Coroide/Retina. 5. Glitazona.

Escola Paulista de Medicina - UNIFESP

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OFTALMLOGIA

CHEFE DO DEPARTAMENTO:

Professora Doutora Denise de Freitas

COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO:

Professor Doutor Mauro Campos

ORIENTADORA:

Professora Doutora Cristina Muccioli

Universidade Federal de São Paulo

Escola Paulista de Medicina, Departamento de Oftalmologia, São Paulo, SP – Brasil.

COORIENTADOR:

Professor Doutor Dalton Bertolim Précoma

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Departamento de Cardiologia, Curitiba, PR – Brasil.

À minha esposa, Andréa Luchini,
e às minhas filhas:
Mebaliah Luchini de Almeida Torres e
Lorraine Luchini de Almeida Torres.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Prof[a]. Dr[a]. Cristina Muccioli**, que com seu profissionalismo e competência inspirou-me e estimulou-me a fazer o Doutorado na UNIFESP.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma,** que tornou possível a realização deste sonho. Sem me conhecer, acreditou no meu potencial e forneceu todo o subsídio para a realização desta pesquisa.

Ao coautor de todos os trabalhos publicados, **Prof. Dr. Maurício Maia,** que sempre esteve disponível para ajudar-me. Por inúmeras vezes atendeu minhas ligações telefônicas para me orientar.

À docente da Pós-Graduação da PUC-PR, **Prof[a]. Dr[a]. Lúcia Noronha**, que foi fundamental na elaboração do desenho da experimentação e na análise do material histológico.

Ao Diretor do Hospital Angelina Caron, **Dr. Pedro Caron,** que cedeu espaço, funcionários e tempo de uso do seu Hospital, em Campina Grande do Sul-PR.

À responsável pelo Departamento de Estatística da PUC-Pr, **Prof[a]. Dr[a]. Márcia Orlandoswki**, pela orientação e ensinamento dos princípios de bioestatística, que foram úteis para a análise do material coletado.

Ao responsável pelo Departamento de Oftalmologia do Hospital Angelina Caron, **Dr. Décio Brik,** que me incluiu nesta linha de pesquisa.

À Professora de Inglês, **Areta Ulhana Galat,** que com eficiência me auxiliou nas apresentações do *Research Days* e da ARVO, assim como na elaboração dos artigos para as publicações internacionais.

À pós-graduanda em Nutrição pela PUC-PR, **Camila Prim,** que auxiliou nas diversas fases do experimento.

Aos acadêmicos da PUC-PR, **Guilherme Winter, Flávia Kaibe, Alexandra Corporal, Leonardo Brandão Précoma, Greyce Kelly de Souza**, que me auxiliaram em todas as fases do experimento.

À **UNIFESP**, instituição da qual tenho orgulho de fazer parte, que de forma imparcial me aceitou como aluno de pós-graduação. Serve de exemplo para o Brasil de como as instituições deveriam funcionar, com honestidade, eficiência,

responsabilidade e trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Alessi,** pela parceria neste experimento.

À **Residência Médica do Instituto Penido Burnier - Campinas/SP,** na pessoa de seu dedicado preceptor, **Dr. Manoel Penteado Queiroz Abreu**, que foi responsável pela minha formação oftalmológica. Com responsabilidade possibilitou pleno aprendizado e estimulou-me a fazer pesquisas científicas.

Ao **Dr. Milton Baptista Toledo Filho**, responsável pela minha formação em Retina e Vítreo.

Ao **Dr. Isaac Federman**, amigo e parceiro nos meus primeiros trabalhos científicos. Mostrou-me na prática que a Medicina é um ato de muito prazer e realização pessoal.

Aos **Drs. Luiz Carlos Woellner, Airton S. Yamada e Heitor Sato**, que cederam a bioquímica **Gislaine Custódio** e o laboratório Labac para as análises bioquímicas deste experimento.

À **Dr[a]. Tânia Valéria Assad** e à farmácia de manipulação FARMADOCTOR, pela preparação da rosiglitazona.

Aos **funcionários da PUC-PR**, dos setores de técnica operatória, biotério, patologia experimental e da secretária da Pós-Graduação, por sempre serem tão solícitos aos meus pedidos.

À empresa farmacêutica **GlaxoSmithKline,** pelo fornecimento da rosiglitazona na forma de sal base.

Aos meus pais, **Otacito de Almeida Torres (*in memoriam*) e Angela Cosmo Torres**, que dedicaram suas vidas inteiras a criar e educar seus filhos. Suas lições e exemplos orientaram minha vida e fortaleceram meu espírito e mente. Responsáveis diretamente por cada gesto e ato nobre por mim praticado.

Ao meu irmão, **Reginaldo Antônio de Almeida Torres**, que ao lado dos meus pais auxiliou na minha formação intelectual e moral. Com inteligência e amor, sempre me mostrou o melhor caminho a ser seguido.

Aos meus irmãos, **Rosemery Teresinha de Almeida Torres, Renato Pedro de Almeida Torres, Rogério João de Almeida Torres e Rosane do Carmo de Almeida Torres Frecceiro,** pela dedicação e carinho que tiveram comigo durante toda a minha vida.

À minha esposa e coautora de todos os trabalhos, **Andréa Luchini**, que

me estimula a ser diariamente uma pessoa e um profissional melhor.

À minha sogra, **Vera Lúcia Bíscaro Luchini**, que durante estes quatro anos cuidou com amor, zelo e muito carinho das minhas filhas, atenuando a minha ausência.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **Deus**, por ter tanto a agradecer e tão pouco a pedir.

RESUMO

O objetivo deste trabalho é avaliar as anormalidades da esclera, coroide e retina de coelhos induzidas pela dieta hipercolesterolêmica, além da possibilidade de prevenção dessas anormalidades com administração sistêmica de rosiglitazona. Para isto, 54 coelhos *new zealand* foram distribuídos em quatro grupos: grupo-controle (GC) recebeu dieta normal; grupo 1 recebeu dieta hipercolesterolêmica; grupo 2 recebeu dieta hipercolesterolêmica associada à administração diária de 3 mg de rosiglitazona a partir do 14º dia do início do experimento; e grupo 3 recebeu dieta hipercolesterolêmica associada à administração diária de 3 mg de rosiglitazona desde o início do experimento. Os coelhos foram pesados e submetidos à dosagem sérica de colesterol total, triglicerídeos, *high density lipoprotein* (HDL) colesterol e glicemia de jejum no início do experimento, no 14º dia e no momento da eutanásia (42º dia). A esclera e coroide foram submetidas à análise histológica e histomorfométrica. A retina foi submetida à análise imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anticalretinina (CR) e anticorpo *anti-glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Quando positivo para o marcador anticalretinina, duas análises quantitativas foram realizadas. Na primeira, foram contadas todas as células ganglionares imunorreativas. Na segunda, todas as células e elementos celulares imunorreativos foram avaliados pelo exame de morfometria de cores. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Shapiro-Wilks-Testand. Valores abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados referentes ao peso demonstraram significativo aumento nos grupos 1 e 3 em relação ao GC no 14º dia ($p<0,009$), enquanto no 42º dia os grupos 1, 2 e 3 apresentaram representativamente mais peso que o GC ($p<0,023$). Quanto às variáveis laboratoriais, destacaram-se o aumento significativo da glicose e colesterol total de G1 em relação ao controle ($p<0,001$), assim como o acentuado aumento da HDL no G3 em relação aos demais grupos ($p<0,001$), no 14º dia. A HDL manteve-se expressivamente elevada no G3 em relação aos demais grupos no momento da eutanásia ($p<0,001$). À análise histomorfométrica da esclera e coroide obteve-se normalidade do GC. Por outro lado, o G1 mostrou marcante aumento da espessura da esclera e coroide em relação ao GC ($p=0,008$), enquanto que no G3 houve espessamento de esclera e coroide menor que no G1 ($p=0,048$). Elevado número de histiócitos foi observado na parede escleral do grupo submetido à dieta hipercolesterolêmica (G1), seguido de forma decrescente por G2, G3 e GC. A análise imuno-histoquímica da retina com o anticorpo monoclonal anticalretinina ressaltou número mais alto de células ganglionares imunorreativas no G1 que no G3 ($p=0,002$). O exame de morfometria de cores revelou significativa imunorreatividade das células e elementos celulares do G1 em relação aos outros grupos ($p<0,001$). Nesta análise evidenciou-se também acentuada imunorreatividade das células e elementos celulares de G2 e G3 em relação ao GC ($p\leq0,002$). GFAP foi negativo em todos os grupos. Neste modelo, os achados permitem concluir que a hipercolesterolemia provoca anormalidades precoces histomorfométricas e imuno-histoquímicas do complexo esclerocoriorretiniano; e a ativação dos receptores do PPAR gama-ocular, a partir da dieta oral de rosiglitazona, foi efetiva em atenuar tais anormalidades nessas estruturas.

Palavras-chave: Aterosclerose. Degeneração macular relacionada à idade. Colesterol. Esclera, coróide e retina. Glitazona.

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate scleral, choroid and retinal abnormalities in rabbits induced by a hypercholesterolemic diet and the prevention of these abnormalities after oral administration of rosiglitazone in rabbits. Fifty-four new zealand rabbits were divided into four groups: the control group (CG) was fed a normal diet; group 1 G1), a hypercholesterolemic diet; group 2 (G2) a hypercholesterolemic diet associated with daily administration of 3 mg of rosiglitazone from day 14 after the beginning of the diet; and group 3 G3), a hypercholesterolemic diet associated with daily administration of 3 mg of rosiglitazone since the beginning of the experiment. The rabbits were weighed and underwent the following examinations: seric dosages of total cholesterol, triglycerides, cholesterol HDL, and fasting glycemia at the beginning of the experiment, on the 14^{th} day and on the 42^{nd}, the euthanasia day. The sclera and choroid underwent histologic and histomorphometric analyses and the retina underwent immunohistochemical analysis with anti-calretinin (CR) and *anti-glial fibrillary acidic protein* (GFAP) antibody. When positive for the anti-calretinin marker, two quantitative analyses were performed. In the first analysis, all immunoreactive ganglion cells were counted. In the second analysis, all immunoreactive cells and cell elements were studied with the color morphometry method. The data were evaluated using the nonparametric Kruskal-Wallis and the Shapiro – Wilk tests. Values of $p<0.05$ were considered statistically significant. The results obtained showed a significant weight increase in Groups 1 and 3 in relation to CG on Day 14 ($p<0.009$). Additionally, a significant weight increase was observed in G1, G2 and G3 in relation to CG on Day 42 ($p<0.023$). The lab results showed a significant increase in glucose and total cholesterol in G1 in relation to CG ($p<0.001$) on Day 14, as well as a significant HDL increase in G3, when compared with the other groups ($p<0.001$) on Day 14. HDL in G3 was significantly high when compared to the other groups, on the euthanasia day ($p<0.001$). The results obtained regarding weight showed a significant increase in Groups 1, 2 and 3 in relation to CG on Day 14 ($p<0.01$) and Day 42 ($p<0.02$). The lab results showed a significant increase in glucose and total cholesterol in Groups 1, 2 and 3 in relation to CG ($p<0.01$) on Day 14, as well as a significant increase in HDL in G3 when compared with the other groups, on euthanasia day ($p<0.01$). The histomorphometric analysis of CG sclera and choroid presented normal results. Conversely, G1 showed a significant increase in sclera and choroid thickness in relation to CG ($p= 0,008$), whereas G3 showed thickness lower than in G1 ($p=0,048$). A larger number of histiocytes were observed on the scleral wall of the group that was fed the hypercholesterolemic diet (G1), followed, in a descending order, by groups 2 and 3, and the control group. The immunohistochemical analysis of the retina with the anti-calretinin monoclonal antibody showed that G1 presented a larger number of immunoreactive ganglion cells than G3 ($p = 0.002$). The color morphometry showed significant immunoreactivity of G1 cells and cell elements when compared with the other groups ($p<0.001$). A significant immunoreactivity of G2 and G3 cells and cell elements in relation to CG was also observed ($p<0.002$). GFAP results were negative in all groups. The findings of this proposed study model suggest that hypercholesterolemia induces early histomorphometric and immunohistochemical abnormalities in the sclerochorioretinal complex and that the activation of PPAR gamma in ocular cells attenuated these abnormalities with the administration of the oral rosiglitazone diet.

Keys words: Atherosclerosis. Age related macular degeneration. Cholesterol. Sclera, choroid and retina. Glitazone.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO - DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

TRABALHO REALIZADO NO HOSPITAL ANGELINA CARON E NO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA - SÃO PAULO, SP – BRASIL

Este trabalho deu origem às publicações e prêmio:

Publicações:

- Conceitos atuais e perspectivas na prevenção da degeneração macular relacionada à idade. Rogil José de Almeida Torres; Dalton Bertolim Précoma; Maurício Maia; Flávia Kaiber; Camila Prim; Andréa Luchini; Rossane Serafin Matos e Michel Eid Farah. Revista Brasileira de Oftalmologia. 2008; 67(3):142-55.
- Avaliação das alterações precoces na coroide e esclera ocorridas em coelhos hipercolesterolêmicos: estudo histológico e histomorfométrico. Rogil José de Almeida Torres; Maurício Maia; Lucia Noronha; Michel Eid Farah; Andréa Luchini; Décio Brik; Cristina Muccioli e Dalton Bertolin Précoma. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. 2009; 72(1):68-74.
- *Evaluation of early chorioretinal abnormalities in hypercholesterolemic rabbits submitted to the peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) - gamma agonist treatment (roziglitazone): histological and histomorphometric study*. Rogil José de Almeida Torres; Maurício Maia; Cristina Muccioli; Lucia Noronha; Michel Eid Farah; Andréa Luchini e Dalton Bertolin Précoma. Vision-Pan-America. 2009; 8(1).
- Fatores modificáveis da degeneração macular relacionada à idade. Rogil José de Almeida Torres; Maurício Maia; Cristina Muccioli; Guilherme Winter; Greyce Kelly de Souza; Luca Rodrigo Pasqualotto; Andréa Luchini

e Dalton Bertolim Précoma. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. 2009; 72(3):406-12.

- *Evaluation of early abnormalities of the sensory retina in hypercholesterolemia experimental model: an immunohistochemical study*. Rogil José de Almeida Torres; Maurício Maia; Dalton Bertolin Précoma; Lucia Noronha; Andréa Luchini; Leonardo Brandão Précoma; Greyce Kelly de Souza e Cristina Muccioli. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. 2009; 72(6):793-98.
- *Sclerochorioretinal abnormalities in hypercholesterolemic rabbits treated with rosiglitazone: a histomorphometric and immunohistochemical study*. Rogil José de Almeida Torres; Cristina Muccioli, Maurício Maia; Lucia Noronha; Andréa Luchini; Alexandre Alessi; Márcia Olandoski; Michel Eid Farah e Dalton Bertolim Précoma. Foi aceito pela revista "Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging" (APÊNDICE A).

Prêmio:

O trabalho *Sclerochorioretinal abnormalities in hypercholesterolemic rabbits submitted to rosiglitazone treatment* recebeu o prêmio "Região SUL", apresentado como tema livre no XXXV Congresso Braileiro de Oftalmologia, realizado no período de 24 a 27 de agosto de 2009, em Belo Horizonte – MG (APÊNDICE A).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA-1	ATP ligante cassete subfamília A 1
ABCG-1	ATP ligante cassete subfamília G 1
AG	Atrofia geográfica
ANOVA	Análise de variância
Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia
C	Coroide
CAP	Proteína associada à Cbl
CCG	Camada de células ganglionares
CCR2	*Chemokine receptor 2*
CF	Camada de fotorreceptores
CFH	Gene complementar fator H
CFN	Camada de fibras nervosas
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
CR	Anticorpo anticalretinina
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
E	Esclera
ELISA	*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
EPR	Epitélio pigmentário da retina
FDA	*Food and Drug Administration*
GC	Grupo-controle
GFAP	*Anti-glial fibrillary acidic protein*
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4

GyK	Glicerol quinase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
ICQ	Índice cintura/quadril
IG	Índice glicêmico
IGF	Fator de crescimento similar à insulina
IL-1B	Interleucina B
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzível
IRS	Substrato do receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NMMA	*N-monomethyl-l-arginine*
LSD	Método de diferença mínima significativa
MB	Membrana de Bruch
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MMP	Matriz metaloproteinase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MNSR	Membrana neovascular sub-retiniana
NF-kB	Fator de atividade de transcrição
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOS-2	Óxido Nítrico Sintase induzível
NOt	Nervo óptico
NVSR	Neovascularização sub-retiniana
PAD	Pressão arterial diastólica
PAI-1	Inibidor 1 de ativador de plasminogênio
PAS	Pressão arterial sistólica
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK-4	Piruvato deidrogenasequinase 4
pH	Potencial de Hidrogênio

PP	*Pars* plana
PPAR gama	Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissomo
PUC	Pontifícia Universidade Católica
PUFA	*Polyunsaturated Fatty Acids*
RS	Retina sensorial
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SR-B1	S*cavenger receptor-B1*
SR-B2	S*cavenger receptor-B2*
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Moléculas de adesão de células vasculares
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
ω- 3	Ômega 3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 Desenho esquemático do influxo de cálcio intracelular neuronal.... 25
Figura 2 Desenho do projeto..... 47
Figura 3 Frasco da rosiglitazona enviado pelo laboratório..... 49
Figura 4 Administração da rosiglitazona a 2%..... 53
Figura 5 Resumo do sistema para aquisição das imagens..... 57
Figura 6 Esquema dos locais de mensuração morfométrica da esclera e da coroide..... 58
Figura 7 Exame histopatológico da esclera e coroide nos quatro grupos para a realização da morfometria..... 68
Figura 8 Imuno-histoquímica da retina com o anticorpo anticalretinina..... 75
Figura 9 Desenho esquemático demonstrando a fisiopatogênia da DMRI a partir do enrijecimento da parede escleral provocado pelos depósitos de lipídios..... 84
Figura 10 Desenho esquemático mostrando lipídios na membrana de Bruch, responsável pela formação de depósitos na membrana basal e drusas..... 85
Figura 11 Desenho esquemático demonstrando a formação da placa aterosclerótica..... 94

Gráficos

Gráfico 1 Comparação entre os grupos relativa à morfometria da esclera.... 67
Gráfico 2 Comparação entre os grupos relativa à morfometria da coroide.... 70
Gráfico 3 Comparação entre os grupos relativa à morfometria da esclera + coroide..... 72
Gráfico 4 Comparação entre os grupos relativa ao número de células ganglionares imunorreativas à anticalretinina..... 74
Gráfico 5 Comparação entre os grupos relativa à área total retiniana imunorreativa à anticalretinina..... 77

Quadros

Quadro 1 Efeitos indiretos da ativação PPAR gama..... 40
Quadro 2 Demonstrativo do delineamento experimental..... 46
Quadro 3 Fases do preparo da rosiglitazona..... 50
Quadro 4 Farmacotécnica para produção de 200 mL de rosiglitazona a 2%. 50
Quadro 5 Forma de apresentação da rosiglitazona administrada aos animais..... 51
Quadro 6 Preparo da rosiglitazona a 2% e exemplos dos cálculos utilizados..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Peso e variáveis laboratoriais no momento basal..... 62
Tabela 2 Peso e variáveis laboratoriais no 14º dia..... 63
Tabela 3 Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 relativos ao peso e variáveis laboratoriais no 14º dia..... 64
Tabela 4 Peso e variáveis laboratoriais no dia do sacrifício (42º dia)..... 64
Tabela 5 Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação ao peso e variáveis laboratoriais no 42º dia..... 65
Tabela 6 Morfometria da esclera..... 66
Tabela 7 Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação à morfometria da esclera..... 66
Tabela 8 Morfometria da coroide..... 69
Tabela 9 Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação à morfometria da coroide..... 69
Tabela 10 Morfometria da esclera + coroide..... 70
Tabela 11 Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação à morfometria da esclera + coroide..... 71
Tabela 12 Número de células ganglionares imunorreativas à anticalretinina (total dos cinco campos)..... 72
Tabela 13 Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação às células ganglionares imunorreativas à anticalretinina..... 73
Tabela 14 Área total retiniana imunorreativa ao anticorpo anticalretiniana... 76
Tabela 15 Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação à morfometria de cores com o anticorpo anticalretinina..... 76
Tabela 16 Imunorreatividade retiniana ao GFAP..... 77

SUMÁRIO[1]

1 INTRODUÇÃO 23

2 REVISÃO DE LITERATURA 28
2.1 Constatações clínicas e epidemiologia 28
2.1.1 Fatores modificáveis da DMRI aterogênicos 28
2.1.1.1 Aterosclerose 28
2.1.1.2 Elevação do colesterol sérico 28
2.1.1.3 Tabagismo 29
2.1.1.4 Índice de massa corporal (IMC) 30
2.1.1.5 Circunferência abdominal 30
2.1.1.6 Índice cintura/quadril (ICQ) 31
2.1.1.7 Hipertensão arterial sistêmica (HAS) 31
2.1.2 Fatores modificáveis da DMRI antiaterogênicos 32
2.1.2.1 Redutores dos níveis séricos de colesterol 32
2.1.2.2 Dieta 32
2.1.2.3 Atividade física 34
2.2 Constatações experimentais e laboratoriais dos efeitos da hipercolesterolemia 34
2.3 Glitazonas 38
2.4 Estimulação do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR gama) e aterosclerose 40
2.5 Glitazonas e DMRI 42

3 OBJETIVOS 44

4 MATERIAL E MÉTODO 45
4.1 Desenho do experimento 45
4.1.1 Ambiente de experimentação 47
4.1.2 Animais utilizados 48
4.1.3 Preparo da ração suplementar 48

[1] Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

4.1.4 Preparo da rosiglitazona 49
4.1.5 Administração da rosiglitazona 52
4.1.6 Aferições 53
4.1.6.1 Peso 53
4.1.6.2 Glicemia 53
4.1.6.3 Lipídeos 54
4.1.6.4 Análise da esclera, coroide e retina 54
4.1.7 Normas adotadas 54
4.2 PROCEDIMENTOS 54
4.2.1 Anestesia 54
4.2.2 Coleta de amostras 55
4.2.2.1 Sangue 55
4.2.3 Retirada dos globos oculares 55
4.3 Avaliações histopatológicas 55
4.3.1 Preparo das amostras 55
4.3.1.1 Fixação dos espécimes 55
4.3.1.2 Análise histológica 56
4.3.1.3 Análise histomorfométrica quantitativa da esclera e coroide 56
4.3.1.4 Análise imuno-histoquímica da retina 58
4.4 Análise estatística 59

5 RESULTADOS 61
5.1 Peso e variáveis laboratoriais 61
5.2 Morfometria da esclera e coroide 65
5.2.1 Morfometria da esclera 66
5.2.2 Morfometria da coroide 68
5.2.3 Morfometria da esclera + coroide 70
5.3 Análise da imuno-histoquímica com o anticorpo anticalretinina 72
5.3.1 Células ganglionares imunorreativas à anticalretinina 72
5.3.2 Morfometria de cores com o anticorpo anticalretinina 75
5.4 Análise da imuno-histoquímica com o anticorpo GFAP 77

6 DISCUSSÃO 79
6.1 Modelo utilizado 79
6.2 Fisiopatogenia da DMRI e o modelo utilizado 81
6.3 Peso e variáveis laboratoriais 86
6.4 Aspectos histopatológicos da esclera, coroide e retina 87
6.5 Considerações gerais 91
6.6 Perspectivas do uso da rosiglitazona para modelo da DMRI 92

7 CONCLUSÃO 100

REFERÊNCIAS 101

APÊNDICE E ANEXOS 114

1 INTRODUÇÃO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é considerada a principal causa de cegueira irreversível na terceira idade. Importante estudo epidemiológico detectou essa doença em 11,5% das pessoas brancas acima de 80 anos. Estima-se que 1.750 milhão de norte-americanos apresentam DMRI avançada e que, devido à expectativa de vida da população, este número possa dobrar nos próximos 30 anos (FRIEDMAN *et al*., 2004; KLEIN *et al.*, 1995). A importância epidemiológica resultou em inúmeras pesquisas e tratamentos preventivos para tentar evitar a instalação e/ou progressão dessa grave doença ocular. A despeito das grandes somas financeiras investidas nas pesquisas e ensaios clínicos, o máximo que se conseguiu na maioria dos casos foi protelar a perda da visão central. Sendo assim, é importante reconhecer e atuar sobre os fatores considerados modificáveis, eliminando-os ou atenuando-os, com o intuito de retardar ao máximo a instalação dessa doença.

A patogênese da DMRI é controversa e muitas teorias têm sido propostas para tentar explicá-la. Entre elas, destacam-se os fatores cardiovasculares (AMBATI *et al*., 2003). O tabagismo, importante causa de aterosclerose, é tido como um dos principais fatores modificáveis da DMRI (ESPINOSA-HEIDMANN *et al.,* 2006; EVANS, 2001; SMITH *et al*., 2001). Processos imunológicos e inflamatórios, comuns na doença aterosclerótica, também são observados na DMRI (HAGEMAN *et al.*, 2001; KILLINGSWORTH; SARKS; SARKS, 1990; PENFOLD; KILLINGSWORTH; SARKS, 1985; van DER SCHAFT *et al.,* 1993). Níveis altos de lipoproteína de alta densidade (HDL) já foram associados à prevenção da DMRI tardia, enquanto alto nível de colesterol total proporciona alto risco de DMRI tardia (TAN *et al.,* 2007).

Em modelo animal, a dieta rica em colesterol induz anormalidade do complexo esclerocoroideano, lesão nas células endoteliais de capilares intrarretinianos e epirretinianos, aumento de lipídios nas camadas externas da retina e alterações na membrana de Bruch (MICELI *et al*., 2000; ONG *et al*., 2001; RAMÍREZ *et al*., 2006; SALAZAR *et al*., 2007; TRIVIÑO *et al*., 2006). Tais circunstâncias causam isquemia crônica da retina (TRIVIÑO *et al*., 2006),

contribuindo para o aumento do glutamato excitatório, que atua nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) localizados na membrana plasmática das células gliais e neuronais da retina (SUCHER; LIPTON; DREYER, 1997). Hiperestimulação dos receptores glutametérgicos induz aumento do cálcio intracelular para níveis tóxicos. Excessivo influxo de cálcio induz a formação de óxido nítrico sintase (NOS) e consequente liberação de óxido nítrico (NO). Aumento da produção de NO é citotóxico e pode causar morte ou apoptose celular (HU; VAN ELDIK, 1996). Estudos experimentais têm mostrado que a hipercolesterolemia aumenta a expressão de óxido nítrico sintase induzível (NOS-2), conduzindo à peroxidação lipídica e a dano tecidual oxidativo (YÜCEL *et al*., 2005). Tais condições podem causar ou agravar o desenvolvimento da DMRI. Esses fatos demonstram que aterosclerose e DMRI compartilham mecanismos fisopatogênicos similares. A FIG. 1 mostra o influxo de cálcio que ocorre nas células neuronais retinianas, ocasionado pela hipóxia.

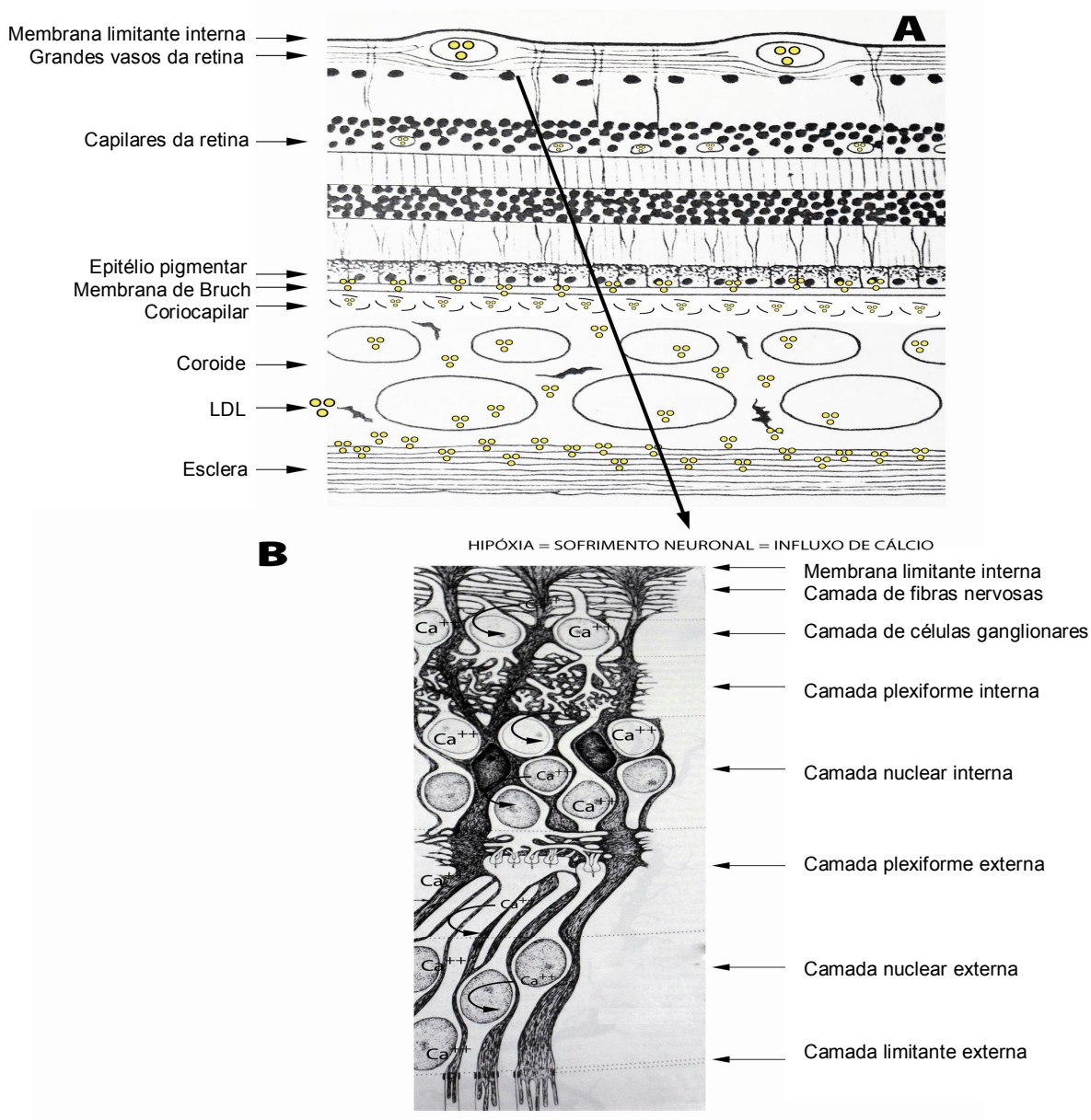


Figura 1 - Desenho esquemático do influxo de cálcio intracelular neuronal.

A dieta rica em colesterol provoca anormalidades do complexo esclerocoroideano, lesão nas células endoteliais de capilares intrarretinianos e epirretinianos, aumento de lipídios nas camadas externas da retina e alterações na membrana de Bruch. Tais alterações podem ocasionar hipóxia do tecido retiniano. A fotografia A mostra a presença de lipoproteína de baixa densidade (LDL) nas várias estruturas anatômicas oculares. A fotografia B representa a imagem ampliada da retina sensorial. Observa-se influxo de cálcio para o interior das células e elementos celulares, ocasionado pela hipóxia retiniana, sugerindo sofrimental neuronal. Fotografia B – Diagrama das células de Müller.

Fonte: Hogan, Alvarado e Weddell (1971, p. 465).

Neste contexto, devem ser ressaltados os efeitos da hipercolesterolemia na gênese da DMRI. Sendo assim, o seu controle passou a ser importante na prevenção dessa doença (McCARTY *et al.,* 2001; McGWIN; XIE; OWSLEY,

2005). Com essas evidências, espera-se que as drogas utilizadas na doença aterosclerótica possam, direta ou indiretamente, ter alguma repercussão no curso da doença macular degenerativa.

Os ativadores do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR gama) pertencem à classe de drogas chamadas de glitazonas e foram utilizadas inicialmente no tratamento de pacientes diabéticos do tipo 2 (ROBERTS *et al.,* 2003). São ligantes sintéticos de alta afinidade para ativar fatores de transcrição pertencentes à superfamília de receptores nucleares. Esses fatores são expressos principalmente no tecido adiposo e na parede vascular arterial normal, sendo superexpressos na parede arterial com placas de aterosclerose (HSUEH; BRUEMMER, 2004; MARX, 2002). Atuam fisiologicamente controlando a adipogênese, expressão de genes que regulam o metabolismo glicêmico, lipídico, a inflamação e a proliferação vascular (YKI-JÄRVINEN, 2004). A ativação do PPAR gama tem resposta imunomoduladora, anti-inflamatória e antiaterosclerótica (PERSHADSINGH, 2004; SÁNCHEZ-HIDALGO *et al.,* 2005).

Na DMRI, essa modalidade de droga foi utilizada somente em um estudo experimental. A efetividade em inibir a membrana neovascular foi atribuída ao efeito antifator de crescimento vascular endotelial (antiVEGF) das glitazonas (MURATA *et al*., 2000). Sabe-se que as glitazonas inibem a migração e adesão de macrófagos no endotélio vascular, reduzindo o fator de necrose tumoral, a proteína C-reativa, metaloproteinase, ligantes C40 solúveis e inibidor 1 de ativador de plasminogênio (KUREBAYASHI *et al*., 2005; PATEL *et al.,* 2006; ZIRLIK *et al*., 2004). Também reduzem a expressão das moléculas de adesão endotelial - moléculas de adesão de células vasculares (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular (ICAM-1) - e a migração transendotelial de monócitos, diminuindo a expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e seus receptores CCR2 (*Chemokine receptor 2*) nos monócitos (JACKSON *et al*., 1999; PASCERI *et al.,* 2000). Estudos experimentais demonstraram que o epitélio pigmentário da retina (EPR), os monócitos e os macrófagos, assim como seus produtos, citocinas inflamatórias e enzimas promotoras de degradação da matriz extracelular, contribuem para a proliferação de neovasos sub-retinianos na DMRI (COUSINS; ESPINOSA-HEIDMANN; CSAKY, 2004; GROSSNIKLAUS *et al*., 2002, LAMBERT *et al*., 2001; OH *et al*., 1999; SAKURAI *et al.,* 2003a e 2003b;

STEEN *et al.,* 1998). Desta forma, torna-se evidente que a ativação dos agonistas do PPAR gama transcende o efeito antiVEGF, apresentando também outros caminhos para inibir a membrana neovascular sub-retiniana (MNSR).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Constatações clínicas e epidemiologia

2.1.1 Fatores modificáveis da DMRI aterogênicos

2.1.1.1 Aterosclerose

O estudo de van LEEUWEN et al. (2003) demonstrou relação entre espessamento da parede da artéria carótida comum e risco significativamente aumentado de DMRI. Sendo assim, formulou-se a hipótese de que a estenose de vasos centrais ocasionaria diminuição da oferta de sangue para a artéria oftálmica e consequente redução da circulação coroidal e retiniana. Os autores salientaram que a aterosclerose subclínica pode promover o desenvolvimento de drusas e outros sinais iniciais da doença macular degenerativa.

Outra pesquisa referiu que placas ateroscleróticas na bifurcação da carótida estavam associadas a aumento de 4,7 vezes da prevalência de DMRI, enquanto que placas localizadas na artéria carótida comum e nas artérias periféricas tiveram prevalência aumentada de 2,5 vezes. Apesar de demonstrada forte associação entre a aterosclerose e DMRI na população mais idosa, os autores sugeriram a realização de estudos complementares com o intuito de responder se a aterosclerose é uma causa direta da DMRI ou se ocorre concomitantemente a outros fatores de risco (VINGERLING *et al*., 1995).

2.1.1.2 Elevação do colesterol sérico

Comparando as lipoproteínas séricas aterogênicas com as não-aterogênicas com o objetivo de verificar se o aumento do colesterol sérico seria um fator de risco para DMRI, foram analisados indivíduos com mais de 50 anos e que apresentavam acuidade visual de 20/80, ou melhor, em pelo menos um olho. Desta forma, foram mensuradas as seguintes apoliproteínas sanguíneas:

apolipoproteína B (apoB), a principal representante das LDLs, e apolipoproteína A (apoA-I), a principal representante de HDL. Os níveis de apoB em pacientes sem maculopatia, sinais leves, intermediários e avançados de DMRI foram, respectivamente, de 93,3, 91,8, 95,2 e 98,2 mg/dL. Mesmo não apresentando significância, os valores encontrados mostraram que o colesterol sérico elevado está associado à doença avançada.

Em relação às HDLs, os valores encontrados para os mesmos grupos supracitados foram 147,4, 148,6, 141,0 e 144,9. Esses dados enfatizam que níveis mais altos de apoA-I estão relacionados aos sinais iniciais da doença ou à ausência da doença degenerativa macular, sugerindo o efeito protetor dessas lipoproteínas. O colesterol total medido nos mesmos grupos foi, respectivamente, de 201, 198, 194 e 203. Sendo assim, concluiu-se que altos níveis lipídicos podem desempenhar importante papel no desenvolvimento inicial da DMRI (DASHTI, *et al.,* 2006).

2.1.1.3 Tabagismo

O tabagismo é considerado o fator de risco mais importante para o desencadeamento da DMRI (SMITH *et al*., 2001; VINGERLING *et al.,* 1996). A correlação entre o tabagismo e a DMRI avançada, ou seja, atrofia geográfia e neovascularização, já foi descrita (TAN *et al*., 2007). A fisiopatogenia não foi totalmente elucidada, porém supõe-se que o cigarro diminua os níveis plasmáticos de antioxidantes, afetando de forma indireta o metabolismo coriorretiniano (STRYKER *et al*., 1988). Há estudos sugerindo que o tabagismo promove aterosclerose dos vasos da coroide, levando à atrofia geográfica (AG) e à neovascularização sub-retiniana (NVSR) (VINGERLING *et al*., 1996).

Foi comprovado que a nicotina, isolada ou em associação a fatores de crescimento, pode provocar neovascularização da coroide (SUÑER *et al*., 2004). Outro estudo corroborou tais achados confirmando que o cigarro causa danos ao EPR, formação de drusas, lesão da membrana de Bruch (MB) e consequente crescimento de neovasos sub-retinianos (BAILEY *et al*., 2004). Acredita-se que tais alterações sejam provocadas pelo efeito direto da nicotina, que ativa mediadores

pró-inflamatórios (SASTRY; HEMONTOLOR, 1998). Sabe-se também que tabagistas podem apresentar redução no gene complementar fator H (CFH), que está associado a alto risco de degeneração macular (ESPARZA-GORDILLO *et al*., 2004).

Outro estudo salientou que o tempo de exposição ao tabaco, seja ele de forma ativa ou passiva, bem como a carga tabágica, são de muita importância no aumento do risco de desenvolvimento e incidência da doença. Fumantes ativos ou ex-fumantes há menos de 20 anos apresentam mais risco de desenvolver a doença do que aqueles que cessaram o tabagismo há mais de 20 anos ou que nunca fumaram (KHAN *et al*., 2006).

2.1.1.4 Índice de massa corporal (IMC)

O índice de massa corporal (IMC), que avalia o grau de obesidade, é calculado dividindo-se o peso, em Kilogramas, pela altura, em metros, ao quadrado. O componente inflamatório, muitas vezes associado à obesidade e às doenças cardiovasculares, pode ser o elemento comum entre o IMC e a DMRI.

Pesquisa prospectiva que dividiu o IMC em três categorias, <25, 25-29 e >30 Kg/m², demonstrou que elevado IMC aumenta o risco de progressão da DMRI. Risco relativo de 2,32 para IMC entre 25 e 29 Kg/m²; de 2,35 para IMC superior a 30 Kg/m²; e IMC inferior a 25 Kg/m² não apresentaram associação com DMRI (SEDDON *et al.,* 2003). Outro estudo prospectivo de caso-controle realçou que o aumento do IMC estava associado à DMRI neovascular (AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP, 2000). Entretanto, em outro relato não foi observada tal associação (SMITH *et al*., 2001).

2.1.1.5 Circunferência abdominal

O padrão de distribuição de gordura corporal estabelece diferenças prognósticas mais importantes que o índice de massa corporal (IMC) para doenças cardiovasculares e síndrome metabólica. Sabe-se que indivíduos que

apresentam circunferência abdominal aumentada (>102 cm para homens e >80 cm para mulheres) têm distribuição adiposa mais visceral, com risco de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica. Indivíduos com DMRI precoce ou intermediária, com distribuição de gordura visceral aumentada, têm elevado risco de evoluir para DMRI avançada (SEDDON *et al*., 2003).

2.1.1.6 Índice cintura/quadril (ICQ)

O ICQ é definido pela divisão do perímetro abdominal (entre a última costela e a crista ilíaca) pelo perímetro do quadril (nível dos trocânteres femorais). Índice acima de 0,8, em mulheres e de 0,9 em homens está correlacionado com melhor distribuição de gordura visceral, em detrimento da periférica, ou seja, alto risco de doença cardiovascular e síndrome metabólica. A associação entre esse fator e DMRI também está vinculada ao componente inflamatório. Estudo associou aumento da gordura visceral e risco de DMRI precoce e evolução da DMRI intermediária para a avançada (SEDDON *et al*., 2003).

2.1.1.7 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Já se constatou que a HAS influencia na circulação da coroide (METELITSINA *et al*., 2006). Existem publicações afirmando que o controle da HAS pode diminuir o risco de DMRI (HYMAN *et al.,* 2000; van LEEUWEN *et al*., 2003). Associações entre DMRI neovascular e níveis tensóricos elevados e pressão arterial diastólica (PAD) acima de 95 mmHg já foram detectadas em estudos populacionais de caso-controle, assim como a diminuição esteve associada à redução da DMRI inicial (HYMAN *et al*., 2000; van LEEUWEN *et al*., 2003). O aumento da pressão arterial sistólica (PAS) e da pressão de pulso eleva o risco de desenvolver drusas e outros sinais da DMRI inicial e exsudativa (AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP, 2000). Porém, estudo envolvendo três grandes ensaios clínicos não correlacionou a HAS com a DMRI (SMITH *et al*., 2001).

2.1.2 Fatores modificáveis da DMRI antiaterogênicos

2.1.2.1 Redutores dos níveis séricos de colesterol

McCarty *et al*. (2001) avaliaram 2.594 pacientes com mais de 40 anos durante cinco anos, acentuando que aqueles em uso de medicações redutoras do colesterol desde o início do experimento apresentaram risco quatro vezes mais baixo de progressão da degeneração macular do que aqueles que não fizeram uso.

Coorte populacional acompanhou 12.588 indivíduos entre 45 e 65 anos. A utilização de drogas redutoras de colesterol diminuiu significativamente o risco relativo de desenvolver a DMRI. No entanto, preconizou-se que estudos adicionais são necessários para documentar o mecanismo responsável por essa associação (McGWIN; XIE; OWSLEY, 2005).

Caso-controle que avaliou 18.007 pacientes com diagnóstico de DMRI e 86.169 controles verificou que o risco relativo de uso de estatinas e DMRI foi de 1,32 sem ajustes e de 0,93 quando feitos ajustes para idade, sexo, hábitos de vida, aterosclerose, hiperlipidemia, doenças cardiovasculares, entre outros. Desta forma, parece não haver diferença estatística entre os grupos em uso de drogas redutoras de colesterol por menos de cinco anos. Entretanto, acima de cinco anos de uso de estatinas registrou-se diminuição do risco de DMRI, sugerindo, assim, certo fator protetor contra o desenvolvimento de neovascularização (SMEETH *et al.,* 2005).

2.1.2.2 Dieta

Reconhecidamente, a dieta é um dos meios mais eficientes para a atuação preventiva no desenvolvimento da DMRI. Dietas ricas em nutrientes antioxidantes, zinco e peixe ou ácidos graxos ômega 3 (ω-3) estão associadas a baixas taxas de DMRI. Foi recomendado o uso de vitamina E através do consumo de grãos (cereais, trigo, cevada), óleo vegetal, ovos e nozes, enquanto que o zinco está presente nos grãos, laticíneos, carne vermelha, aves e peixes. Cenoura, couve,

repolho e espinafre são os principais suplementos do beta-caroteno, enquanto a vitamina C é encontrada em frutas cítricas, pimenta verde, brócolis e batatas. A luteína e zeaxantina estão presentes em frutas e legumes. Van Leeuwen *et al*. (2005) afirmam que consumir alimentos contendo tais nutrientes é mais importante que suplementos nutricionais.

Em contrapartida, a ingestão de alimentos com alto índice glicêmico (IG) possibilita o desenvolvimento de DMRI 2,71 vezes mais que o consumo de dieta com baixo índice glicêmico (frutas, cereais, verduras, pães integrais) (CHIU *et al*., 2006). A ingestão total de gordura também está associada a alto risco de desenvolvimento da doença, enquanto que o consumo de peixe quatro vezes por semana ou mais exibiu baixo risco de DMRI. A relação inversa não aconteceu com a ingestão aumentada de ácido linoleico. Os autores concluíram que a ingestão total de gorduras tem alta influência na gênese da DMRI e que o ácido linoleico, ácido graxo duplamente insaturado, promove mais dano oxidativo macular (CHO *et al*., 2001).

Outro estudo revelou que a alta ingestão de gordura vegetal aumenta 2,2 vezes a possibilidade de desenvolvimento de degeneração macular. Registrou-se significativa associação entre DMRI e gorduras saturadas ($p=0,04$), monoinsaturadas ($p<0,001$) e gorduras poli-insaturadas ($p=0,009$). Porém, a relação entre ingestão de gordura animal e DMRI não adquiriu significância estatística. Considerou-se, então, que uma dieta que substitua carboidratos por gordura vegetal está positivamente associada ao risco de degeneração macular. Apurou-se também que o ácido linoleico eleva acentuadamente o risco da doença ($p=0,004$). Entretanto, a ingestão de ácidos graxos do tipo ω-3 teve ação contrária à do ácido linoleico, ou seja, diminuiu o risco de DMRI. A ingestão regular de peixes mostrou proteção contra a DMRI, mas apenas nos indivíduos com baixo consumo de ácido linoleico. Desta forma, o estudo concluiu que não apenas a ingestão total de gorduras, mas também dietas baseadas em certos tipos de gorduras podem aumentar o risco de DMRI, enquanto outras podem diminui-lo (SEDDON *et al*., 2001).

O consumo de ω-3 diminui o risco de DMRI e a ingestão de peixes pelo menos uma vez por semana pode reduzir 40% o risco da doença precoce. Relatou-se, ainda, que participantes cujo consumo de peixe excedeu três vezes

na semana tiveram retardo do risco da doença tardia. Por outro lado, a ingestão de altas doses de ácido linoleico foi relacionada ao aumento do risco de DMRI. Participantes do grupo de menos consumo total de gorduras apresentaram risco 70% mais baixo de doença precoce que aqueles que ingeriram alta quantidade. A pesquisa concluiu que dieta rica em ω-3 proveniente dos peixes reduz o risco do desenvolvimento da DMRI, tanto precoce quanto tardia (CHUA *et al*., 2006).

A relação inversa entre alta ingestão de gorduras do tipo poli-insaturadas ω-3 e DMRI do tipo neovascular já foi verificada. Resultado semelhante foi encontrado com o alto consumo de peixes, seja ele assado ou frito. Porém, dietas ricas em ácido araquidônico (ácido graxo poli-insaturado n-6) aumentaram significativamente o risco de DMRI neovascular, provavelmente por ser precursor de mediadores inflamatórios. Assim, como os outros artigos, esse também concluiu que o consumo de peixes e alimentos ricos em ω-3 diminui o risco de degeneração macular avançada, particularmente da forma neovascular (SanGIOVANNI *et al*., 2007).

2.1.2.3 Atividade física

Estudo reportou que a prática esportiva regular reduz o avanço da DMRI precoce e intermediária para a tardia em aproximadamente 25%, ao comparar com pessoas que não praticam (SEDDON *et al*., 2003).

2.2 Constatações experimentais e laboratoriais dos efeitos da hipercolesterolemia

Alterações esclerais e coroideanas em coelhos, provocadas pela dieta rica em colesterol, já foram referidas na literatura (QUEIROZ; VIANA; SILVA, 1958; COGAN; KUWABARA, 1959). Experimento que consistiu na administração diária de 0,75% de colesterol e 2,5% de colesterol a coelhos durante seis meses detectou presença de depósitos lipídicos na superfície interna da coroide, assim como células espumosas (histiócitos) e gotículas de lipídios no tecido conectivo.

Ponderou-se sobre a possibilidade de redução na circulação sanguínea ocular provocada pela hipercolesterolemia (JANES, 1964).

Em modelo animal com camundongo C57BL/6J, foi demonstrado que a administração de dieta altamente gordurosa (15% gordura total e 1,25% colesterol) durante 30 semanas provoca alterações na MB, como espessamento, buracos na lâmina elástica e acúmulos de partículas microscópicas densas. Também foram informadas alterações no EPR como vacúolos citoplasmáticos e acúmulos de gotículas de lipídios no citoplasma das respectivas células (MICELI *et al*., 2000).

Outro estudo mencionou alterações do EPR e membrana de Bruch em olhos de camundongos submetidos à dieta hipercolesterolêmica durante 25 semanas. Foram realizadas avaliações eletrorretinográficas, histológicas, à microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquímicas. A microscopia enfatizou que o grupo apolipoproteína E (apoE-C) teve significativa redução no número de células nas camadas nucleares internas e externas. A microscopia eletrônica de transmissão dos camundongos apoE-deficiente destacou condensação da cromatina nuclear e vacuolização perinuclear das células da camada nuclear interna. A MB encontrava-se mais espessa, com a lâmina elástica desorganizada e descontínua. À imuno-histoquimica registrou-se diminuição ou ausência de imunorreatividade para anidrase carbônica II e calretinina nas camadas retininas dos ratos apoE-deficientes. É importante ressaltar que camundongos normais submetidos à dieta hipercolesteolêmica (C57-C) manifestaram alterações em todos os quesitos (eletrorretinografia, microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquímica), o que comprova que a ingestão desse tipo de dieta tem potencial para provocar no camundongo alterações similares à DMRI humana (ONG *et al*., 2001).

Outro trabalho analisou os efeitos ultraestruturais da retina em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Coelhos *new zealand* foram distribuídos em dois grupos: controle (G0; n=10), alimentados com dieta padrão durante oito meses; hipercolesterolêmicos (G1; n=10), alimentados com dieta enriquecida com colesterol 0,5% por oito meses. Os olhos foram avaliados à microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquímica *(anti-glial fibrillary acidic protein,* GFAP). Em comparação com G0, o G1 exibiu alterações em todas as camadas retinianas,

que foram mais intensas nas áreas com lesão do EPR. No G1, a MB encontrava-se mais espessa devido à existência de partículas nas camadas colágenas; o citoplasma do EPR mostrou corpos densos, debris de membranas celulares, vacúolos e acúmulos de lipídios; foram detectadas áreas de necrose e apoptose em diferentes camadas da retina; células de Müller e astrócitos foram reativos como exemplos de apoptose e necrose; algumas células de Müller preencheram os espaços vazios deixados por neurônios degenerados em todas as camadas retinianas; alguns núcleos das células de Müller estavam deslocados para a camada de fibras nervosas (CFN); astrócitos perivasculares epirretinianos continham gotas de lipídios; a camada de fibras nervosas da retina apresentava poucos astrócitos e a membrana basal dos capilares na CFN era mais espessa. Esse estudo demonstrou que o excesso de colesterol provoca alterações ultraestruturais na retina de coelhos, similares àquelas observadas na DMRI humana. Sendo assim, concluiu-se que a dieta rica em lipídios pode ter o potencial de induzir a doença retiniana (TRIVIÑO *et al*., 2006).

A análise das alterações coroideanas ocorridas com dieta hipercolesterolêmica, assim como eventual reversibilidade do quadro, foi o objetivo de um estudo experimental. Coelhos foram distribuídos em três grupos: G0, dieta normal; G1A, dieta enriquecida, colesterol 0,5% por oito meses; e G1B, dieta igual à do G1A seguida por dieta normal durante seis meses. Os olhos foram submetidos à avaliação sob microscopia eletrônica de transmissão. Observaram-se gotículas de colesterol na supracoroide comprimindo as camadas vasculares e provocando hipertrofia das células endoteliais e musculares lisas vasculares. Verificou-se que a espessura da supracoroide encontrava-se aumentada nos coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica, devido à abundância de fibras colágenas. Constatou-se maior quantidade de lipídios nos espaços intervasculares da coroide dos coelhos hipercolesterolêmicos. Concluiu-se que a normalização do colesterol sérico não é suficiente para reverter dano vascular induzido pelo colesterol e que essas alterações poderiam provocar isquemia crônica, induzindo a degeneração retiniana (SALAZAR *et al*., 2007).

A expressão aumentada do VEGF já foi relatada em camundongos transgênicos com deficiência do receptor LDL, submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Após dois meses de dieta enriquecida com colesterol,

percebeu-se que o EPR, a camada plexiforme externa e segmentos internos dos fotorreceptores encontravam-se imunorreativos ao VEGF. Foram descritos também acúmulos de lipídios na MB (RUDOLF *et al*., 2005).

O papel da apoE no transporte reverso do colesterol no EPR foi analisado utilizando-se culturas primárias de células do EPR de doador humano. Os exames de *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) e *western blotting* mostraram que as células do EPR secretam apoE das superfícies basal e apical. Nesse relato foi formulada a hipótese de que a apoE secretada pelas células do EPR interage com HDL. Desta forma, percebeu-se que a apoE desempenha função no trânsito de lipídios do EPR para a coriocapilar (ISHIDA *et al*., 2004).

Utilizando também cultura de células do EPR de doador humano, foi realizado experimento para determinar se a HDL pode estar envolvida no transporte reverso de colesterol das células do EPR. Os lipídios, radiomarcados previamente, originados da fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, são transportados através do EPR por efluxo, pela superfície basolateral dessas células. Esses lipídios estavam ligados preferencialmente à HDL, de baixo e alto peso molecular. Encontrou-se também que as apolipoproteínas A1 (apoA-1) estimulam o efluxo de lipídios em aproximadamente 50%. Devido ao peso molecular da apoA1, que é de 28 Kda (Kilodalton), deduziu-se que essa apolipoliproteína pode exercer importante papel em atravessar a MB de pessoas idosas, facilitando a remoção de lipídios do EPR e MB. Esse estudo também destacou os efeitos antioxidantes da HDL e sugeriu que o transporte reverso do colesterol poderá vir a ser alvo terapêutico para o estágio inicial da DMRI (ISHIDA *et al.,* 2006).

Em culturas primárias de células do EPR humano revelou-se expressão ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para *receptor scavenger-B1* (SR-B1) e *receptor scavenger-B2* (SR-B2) por meio dos exames de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), *western blotting* e imuno-histoquímica. Foi feita analogia entre a fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, realizada pelas células do EPR, e a fagocitose de células apoptóticas e apolipoproteínas, realizada pelos macrófagos. Nas duas circunstâncias, a absorção de lipídios foi realizada via *scavenger receptor*. Tais achados são importantes, pois salientam o papel e o mecanismo de ação dos

fotorreceptores na absorção de lipídios oxidados, sugerindo que a regulação dos *scavengers receptor* (CD36, SR-BI e SR-BII) pode ser fundamental na patogênese da DMRI. Desta forma, essa investigação também contribuiu para demonstrar a similaridade entre a fisiopatogenia da doença aterosclerótica e a doença degenerativa da mácula (DUNCAN *et al.,* 2002).

2.3 Glitazonas

O receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo é membro de uma superfamília de 48 receptores intranucleares, incluindo os hormônios esteroides e tireoidianos. Formam heterodímeros com o receptor X retinoide para exercer efeitos de transcrição genética, regulando a expressão gênica em resposta a ligantes específicos (BERGER; MOLLER, 2002; PAKALA *et al*., 2004). Existem três diferentes isoformas de PPARs: PPAR alfa, PPAR beta/delta e PPAR gama (CHAWLA *et al.,* 2001a).

O PPAR alfa é expresso predominantemente no fígado, coração, músculos e parede vascular. Sua ativação facilita a oxidação de ácidos graxos e estimula a expressão de múltiplos genes que regulam a concentração de lipoproteínas. Apresenta efeito anti-inflamatório, assim como previne ou retarda a aterosclerose em animais e seres humanos. Os fibratos, utilizados para tratamento de hipertrigliceridemia, são seus principais agonistas (BARBIER *et al*., 2002).

O PPAR beta/delta é expresso predominantemente na pele, cérebro e tecido adiposo. Mesmo sendo demonstrada experimentalmente sua participação no metabolismo do colesterol HDL, a atividade do PPAR beta/delta é pouco conhecida (BERGER; MOLLER, 2002; TAN *et al*., 2001).

O PPAR gama é expresso abundantemente no tecido adiposo. É encontrado também nas células beta-pancreáticas, fígado, músculo-esquelético, rins, epitélio colônico e nas células da parede vascular arterial (PATEL *et al*., 2006). Na parede arterial, o PPAR gama está presente nas células musculares lisas, células endoteliais e macrófagos (PAKALA *et al*., 2004; WILLSON; LAMBERT; KLIEWER, 2001). A expressão tecidual dos PPARs gama ocorre entre as diferentes espécies de animais, porém as diversidades de distribuição entre os

animais e os humanos devem ser observadas (DESVERGNE; WAHLI, 1999).

Em 1995, quando as glitazonas foram reconhecidas como agonistas do PPAR gama, iniciaram-se muitos estudos experimentais e clínicos. A primeira droga dessa classe de medicamentos a ser aprovada nos Estados Unidos foi a troglitazona (nome da medicação: Rezulin®, empresa: Warner-Lambert). Administrada para tratar o diabetes tipo 2, foi retirada do mercado americano no ano de 2000 por causar hepatotoxicidade. As duas drogas representantes dessa classe de medicamentos, disponíveis atualmente para o uso clínico, liberadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1999, são a rosiglitazona (nome da medicação: Avandia®, empresa: GlaxoSmithKline) e a pioglitazona (nome da medicação: Actos® – empresa: Takeda/ Abbott) (YKI-JÄRVINEN, 2004).

Uma das pricipais características das glitazonas é a indução do aumento da sensibilidade insulínica. A primeira teoria que tentou explicar essa ação foi denominada hipótese do roubo dos ácidos graxos. Essa teoria sugere que o estímulo direto dos agonistas do PPAR gama promove transformação de pré-adipócitos em adipócitos e consequente acúmulo de gordura dentro do tecido adiposo, o que ocasiona aumento da massa de tecido adiposo subcutâneo. Deste modo, a gordura acumula-se em local apropriado, poupando os demais tecidos dos efeitos deletérios do excesso de ácidos graxos (PICARD; AUWERX, 2002). A segunda hipótese atribui aos agonistas do PPAR gama a regulação da expressão de vários genes (QUADRO 1) (BERGER *et al*., 2003; BERGER; MOLLER, 2002), sendo considerada, assim, efeito indireto dessa droga sobre a sensibilidade insulínica. Neste sentido, ganha destaque o aumento da produção da adiponectina, uma adipocitoquina produzida exclusivamente pelos adipócitos, que além de reduzir a resistência insulínica apresenta também propriedades antiateroscleróticas (YKI-JÄRVINEN, 2004).

QUADRO 1

Efeitos indiretos da ativação PPAR gama

LOCAL	ATIVIDADE	EFEITO
Fígado	Diminui inflamação	Reduz proteína C reativa
Músculo-esquelético	Captação de glicose	Aumenta GLUT-4, aumenta fosfatidil 3-quinase Diminui PDK-4
Tecido adiposo	Diferenciação de adipócitos	Aumenta transformação de pré-adipócitos em adipócitos
	Captação e armazenamento de ácidos graxos	Aumenta a proteína-1 transportadora de ácido-graxos, Aumenta a acil-coenzima A sintetase
	Lipólise intravascular	Aumenta a lipoproteína lípase
	Captação de glicose	Aumenta IRS-1, aumenta IRS-2, aumenta fosfatidil 3- quinase, aumenta GLUT-4, aumenta CAP, aumenta GyK
	Outras	Aumenta adiponectina, diminui 11beta-hidroxiesteroide deidrogenase-1
Parede vascular	Moléculas de adesão Vasoconstrição	Diminui VCAM-1, diminui ICAM-1 Diminui endotelina
	Efluxo de colesterol	Aumenta ABCA-1, aumenta SR-B1
	Outras	Diminui Interleucina-6, diminui MMP-9, diminui MCP-1, aumenta eNOS, diminui iNOS, diminui PAI-1

GLUT - insulina sensível transportador de glicose, **PDK-4** – piruvato deidrogenasequinase-4, **IRS** - substrato do receptor de insulina, **CAP** – CBL proteína associada, **GYK** – glicerol quinase, **VCAM-1** - molécula de adesão vascular-1, **ICAM-1** – molécula de adesão intercelular-1, **ABCA-1** - ATP ligante cassete-1, **SR-B1** – *scavenger receptor* -B1, **MMP-9** – matriz metaloproteinase-9, **MCP-1** - proteína de quimiotaxia de monócitos-1, **ENOS** – óxido nítrico sintetase endotelial, **INOS** – óxido nítrico sintetase induzível, **PAI-1** - inibidor do plasminogênio ativado-1.

2.4 Estimulação do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR gama) e aterosclerose

O PPAR gama está presente nas principais células da parede arterial,

incluindo células endoteliais, células musculares lisas, monócitos e macrófagos (LAW *et al*., 2000; MARX *et al.,* 1998a; RICOTE *et al*., 1998a). Lesões ateroscleróticas em humanos também expressam o PPAR gama nas células musculares lisas e macrófagos (MARX *et al.,* 1998b; PAKALA *et al*., 2004). Monócitos apresentam PPAR gama, porém observa-se superexpressão quando os mesmos se transformam em macrófagos (MARX *et al.,* 1998b).

O tratamento com as glitazonas diminui os marcadores de atividade aterosclerótica nas placas, sugerindo efeito adicional além do controle metabólico (MINAMIKAWA *et al.,* 1998).

Pesquisadores confirmaram que a ativação do PPAR gama inibe a expressão e a atividade da metaloproteinase-9 (MARX *et al.,* 1998b), assim como a expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 pelas células endoteliais vasculares (JACKSON *et al*., 1999; PASCERI *et al*., 2000). Comprovou-se, também, que a ativação do PPAR gama reduz a migração transendotelial dos monócitos pela diminuição da expressão do MCP-1 e dos receptores CCR2 (HAN *et al*., 2000).

Os agonistas PPAR gama podem ativar o *scavenge receptor* em macrófagos, chamado de CD 36, que estimula a fagocitose do colesterol LDL oxidado, levando à expressiva formação de células espumosas (CHAWLA *et al*., 2001a; TONTONOZ *et al.,* 1998). Esse processo é considerado um pró-aterogênico da ativação PPAR gama. Porém, o mesmo é compensado pelo estímulo à maior saída do colesterol da célula a partir da ativação de enzimas responsáveis pela via reversa de metabolismo do colesterol. Isto ocorre com base na expressão de ATP ligante cassete subfamília A 1 (ABCA1) e ATP ligante cassete subfamília G 1 (ABCG1), que promove a remoção do colesterol LDL oxidado da parede vascular arterial (ZHANG; CHAWLA, 2004).

A ativação PPAR gama atenua a resposta imune celular pela redução da expressão do complexo de histocompatibilidade do tipo 2, induzida pelo Interferon-γ. Desta forma, ocorre inibição da ativação e proliferação dos linfócitos T CD4+ (KWAK *et al*., 2002).

A rosiglitazona administrada na dose de 3 mg/kg/dia por oito semanas exerceu efeitos vasoprotetores sobre a disfunção endotelial em coelhos hipercolesterolêmicos, mostrando-se, desta forma, ser uma droga antioxidante e

vasodilatadora (TAO *et al*., 2003).

Até 2006 achava-se que o tratamento com as glitazonas poderia resultar em vários efeitos independentes da redução da glicemia e que essa classe de droga teria o potencial de reduzir o risco cardiovascular. Acreditava-se que os agonistas do PPAR gama melhorariam a sensibilidade à insulina, além dos efeitos diretos pleiotrópicos imunomoduladores, anti-inflamatórios e antiateroscleróticos, podendo ter impacto favorável na prevenção da doença cardiovascular, especialmente quando associada ao diabetes *mellitus* tipo II. Aguardava-se até então a conclusão de estudos clínicos sobre a redução de eventos cardiovasculares com o uso de glitazonas em pacientes diabéticos e não-diabéticos (HODIS *et al*., 2006; HSUEH; BRUEMMER, 2004; RÍOS-VÁZQUEZ *et al.,* 2006). Em 2007, uma metanálise de 42 estudos com rosiglitazona em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 evidenciou significativo aumento do risco de infarto do miocárdio (43%) e aumento não-significativo do risco de morte por causa cardiovascular para o grupo em uso da rosiglitazona (NISSEN; WOLSKI, 2007).

No entanto, outro estudo mostrou dados inconclusivos a respeito de risco de hospitalização ou mortes de origem cardíaca. Nesse relato, não foi observado aumento representativo do risco de mortalidade ou morbidade cardiovascular nos pacientes que receberam rosiglitazona, na comparação com o grupo que recebeu drogas hipoglicemiantes convencionais - metformina e sulfonilureias (HOME *et al*., 2009). No momento, aguarda-se a conclusão de outros estudos clínicos para avaliarem-se os efeitos cardiovasculares da rosiglitazona.

2.5 Glitazonas E DMRI

A forma exsudativa da DMRI, caracterizada pela neovascularização sub-retiniana, é a principal causa de perda visual grave abrupta da doença (CIULLA; DANIS; HARRIS, 1998; LEE; WANG; ADAMIS, 1998). Na DMRI exsudativa ocorre crescimento de canais neovasculares a partir da rede vascular da coroide para o espaço sub-retiniano. Esses neovasos permitem o vazamento de plasma e/ou sangue, resultando em lesão irreversível dos fotorreceptores retinianos (LEE;

WANG; ADAMIS, 1998). Essa alteração vascular pode ter início com a ativação e migração das células do EPR, normalmente quiescentes, para dentro do estroma da lesão neovascular (LOPEZ *et al.,* 1996). Estudos identificaram importante papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na patogênese da membrana neovascular sub-retiniana e confirmam que a célula do EPR ativada é a maior fonte de citocinas angiogênicas (KLIFFEN *et al.,* 1997; KVANTA *et al.,* 1996; SHEN *et al.,* 1998; WELLS *et al*., 1996).

Em 2000, Murata *et al.* realizaram um estudo para determinar o efeito antigiogênico dos agonistas do PPAR gama nas células envolvidas na patogênese da neovascularização coroidal *in vitro* e no modelo experimental *in vivo*, em olhos de ratos e macacos. Troglitazona e rosiglitazona foram usadas para avaliar os respectivos efeitos no EPR, proliferação de células endoteliais coroidenas e formação de vasos a partir de células endoteliais coroidenas em resposta ao VEGF. A neovascularização coroideana, induzida pela fotocoagulação, foi avaliada por angiofluoresceinografia e exame histológico após a injeção intravítrea de troglitazona em olhos de ratos (15 experimentais/ 15 controles/ nove queimaduras por olho) e olhos de macacos (dois experimentais/ dois controles/ sete queimaduras paramaculares por olho). Observou-se que o PPAR gama foi expresso em ambos, EPR e células endoteliais coroidenas. Sendo assim, ligantes desse receptor exerceram significativa inibição da proliferação e migração induzida pelo VEGF em ambos os tipos celulares e na formação de vasos a partir de células endoteliais coroidenas. As membranas neovasculares nos ratos foram marcadamente inibidas pela injeção intravítrea de troglitazona. Angiograficamente, registrou-se pouco vazamento. Histologicamente, as lesões apresentaram-se mais finas. Achados similares foram encontrados em olhos de macacos. Aparentemente, não ocorreram efeitos adversos na retina adjacente ou nos olhos dos controles. Os autores concluíram que a inibição da angiogênese coroidena, induzida pelo VEGF *in vitro* e neovascularização coroidena *in vivo*, pelos ligantes do PPAR gama, pode também ocorrer na DMRI exsudativa de seres humanos.

Até o presente momento, a ação farmacológica dos agonistas do PPAR não foi testada como inibidora das anormalidades encontradas na retina, EPR e membrana de Bruch nos casos de DMRI seca.

3 OBJETIVOS

- Demonstrar que anormalidades na esclera, coroide e retina ocorrem precocemente ao administrar-se dieta rica em colesterol a coelhos.
- Demonstrar que essas anormalidades podem ser inibidas ou atenuadas com o uso de agonista do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR gama) - rosiglitazona.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Desenho do experimento

Para a realização deste estudo, o protocolo foi apresentado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Hospital Angelina Caron e Universidade Federal de São Paulo, sob o parecer nº 0806/07, de 20 de julho de 2007 (ANEXO A).

O experimento foi realizado em coelhos *new zealand* tratados com ração enriquecida com colesterol Sigma-Aldrich 95%® na concentração final de 1% por duas semanas e posteriormente alimentados com ração na concentração final de 0,5% por mais quatro semanas, para elucidar a hipótese de que a dieta hipercolesterolêmica provoca anormalidades precoces na esclera, coroide e retina e que a estimulação do PPAR gama, com o uso de rosiglitazona em diferentes momentos, pode atenuar tais anormalidades. Foram definidos quatro diferentes grupos de coelhos, identificados no QUADRO 2. A FIG. 2 mostra o desenho do projeto.

QUADRO 2

Demonstrativo do delineamento experimental

Grupos	Quantidade de animais	Procedimentos
GC	06	Animais com dieta padrão Nuvital® própria para coelho.
G1	12	Animais com dieta padrão Nuvital® , própria para coelho, enriquecida com colesterol a 1% por 2 semanas e a 0,5% por mais 4 semanas.
G2	18	Animais com dieta padrão Nuvital® , própria para coelho, enriquecida com colesterol a 1% por 2 semanas e a 0,5% por mais 4 semanas + rosiglitazona 3 mg/kg/ dia a partir da 3ª semana (14º. dia).
G3	18	Animais com dieta padrão Nuvital®, própria para coelho, enriquecida com colesterol a 1% por 2 semanas e a 0,5% por mais 4 semanas + rosiglitazona 3 mg/kg/ dia desde o início do experimento.

GC: grupo-controle, recebeu dieta padrão Nuvital® própria para coelho; **G1:** grupo dieta colesterol; **G2:** grupo dieta colesterol + rosiglitazona a partir do 14º. dia. **G3:** grupo dieta colesterol + rosiglitazona começando desde o início do experimento. **GC** recebeu dieta normal durante 6 semanas. **G1, G2 E G3** foram submetidos à dieta rica em colesterol a 1% por 2 semanas, a seguir receberam dieta rica em colesterol a 0,5% por mais 4 semanas. Aferições realizadas: peso e dosagem sérica de colesterol total, triglicerídeos, HDL colesterol, glicemia de jejum no início do experimento, no 14º dia e no 42º dia (eutanásia). Avaliação histológica qualitativa, análise morfométrica quantitativa, análise imuno-histoquímica.

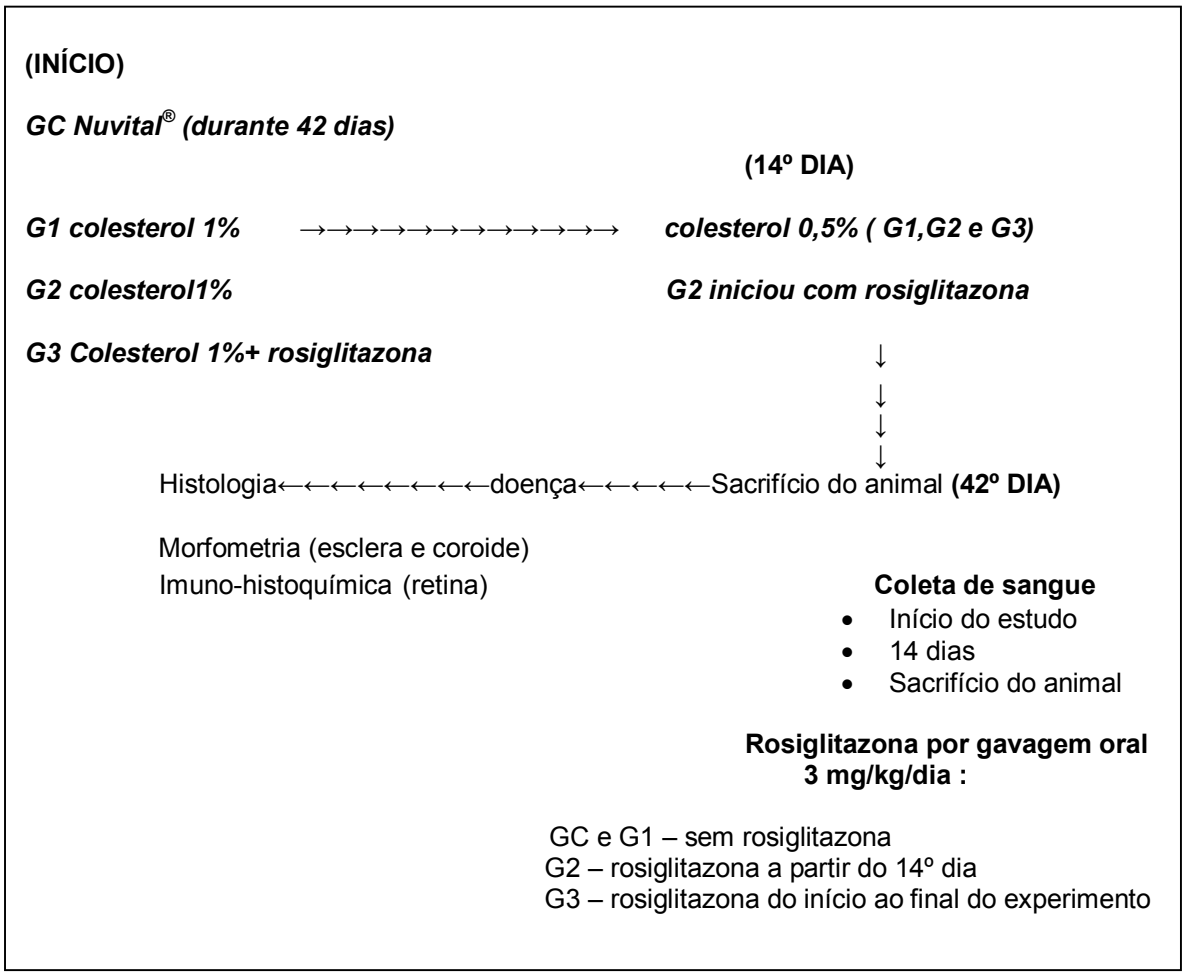


Figura 2 - Desenho do projeto.

GC- Grupo controle; G1- Grupo 1 ; G2- Grupo 2; G3- Grupo 3.

4.1.1 Ambiente de experimentação

Os procedimentos foram realizados nas dependências do laboratório de Técnica Operatória da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e no Centro de Estudos do Hospital Angelina Caron.

Os animais foram mantidos no biotério em macroambiente com ciclos de iluminação 12/12 horas, com trocas de ar e temperatura controlada entre 19 e 23ºC.

Para o microambiente foram utilizadas gaiolas de metal higienizadas diariamente. Os animais receberam durante o experimento água, de forma *ad libitum,* e ração específica para a espécie, Nuvital® (Nuvital, Colombo, Brasil),

enriquecida ou não com colesterol. Cada animal foi mantido em gaiola individual, identificado com numeração sequencial na orelha direita, que foi repetida na face frontal da caixa.

4.1.2 Animais utilizados

Foram utilizados 54 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cunicullus)* da linhagem *new zealand*, provenientes do biotério da PUC-PR, com os pesos aproximados de 2.546 g e com idade média de quatro meses.

Esses animais ficaram no biotério da PUC-PR para um período de adaptação de sete a 10 dias antes do início do experimento.

4.1.3 Preparo da ração suplementar

Para a preparação da ração com concentração de 1% de colesterol, administrada nas primeiras duas semanas, foram utilizados 200 g de colesterol em pó Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 95%, dissolvidos em 800 mL de clorofórmio (Biotec®) e distribuídos em 20 Kg de ração Nuvital®. Foram utilizados 100 g do mesmo colesterol em pó, dissolvidos em 800 mL de clorofórmio, distribuídos em 20 Kg de ração Nuvital®, para a preparação de ração com a concentração de 0,5% de colesterol, administrada nas quatro semanas seguintes.

A ração foi colocada em recipiente plano e largo, sendo distribuída numa camada fina. O colesterol diluído foi regado sob a ração, de forma homogênea. A ração com colesterol foi preparada a cada 14 dias, esperando-se 48 horas após o preparo, para adequada secagem antes de oferecer aos animais. A quantidade diária oferecida foi de 600 g de ração para cada animal (SUN *et al*., 2000).

4.1.4 Preparo da rosiglitazona

A rosiglitazona foi administrada na forma de suspensão a partir de gavagem oral, na dose de 3 mg/kg/dia. Para isto, foram empregadas seringas com capacidade de 1 mL de volume, uma vez ao dia, para os coelhos do grupo 2 e grupo 3.

Para o grupo 2, ela foi administrada no 14º dia e mantida até o final da experimentação. Para o grupo 3, ela foi administrada desde o início do experimento até o dia da eutanásia (42º dia).

Foram recebidos 15 frascos contendo 1 g cada de rosiglitazona em pó a 99,5% de pureza e a 75,1% para base livre (GlaxoSmithKline, Harmine Road, Durham – Inglaterra), demonstrado na FIG. 3 e no ANEXO B.

As orientações para o preparo do medicamento foram enviadas especificamente para este projeto de pesquisa pelo Departamento Científico da GlaxoSmithKline Brasil (LEVI *et al*., 2003; LIU *et al*., 2004; MURTHY *et al*., 2005; SÁNCHEZ-HIDALGO *et al*., 2005; SOROCÉANU *et al*., 2004; TAO *et al*., 2003; YUEN *et al*., 2003).

A medicação foi preparada pela farmacêutica responsável, inscrita no Conselho Regional de Farmácia do Estado do Paraná sob o número 4816, designada em comum acordo entre o pesquisador e a GlaxoSmithKline Brasil.

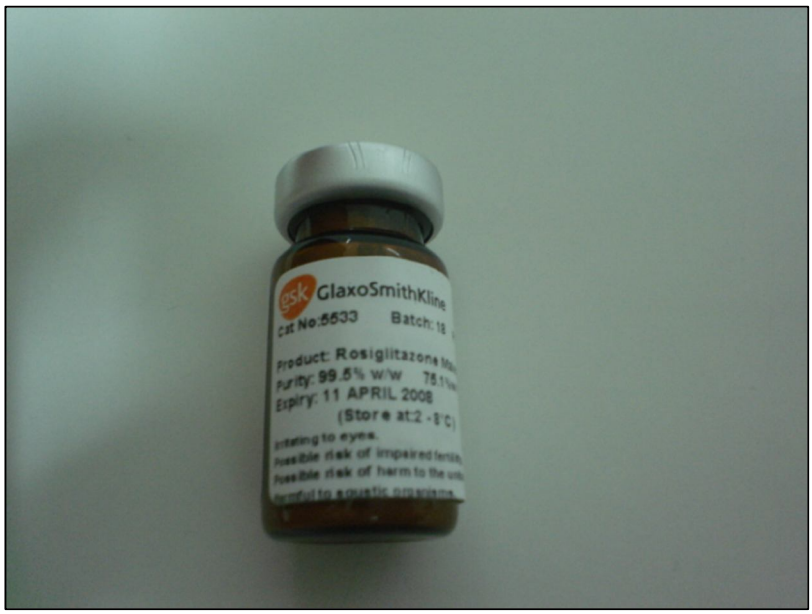


Figura 3 - Frasco da rosiglitazona enviado pelo laboratório.

Frasco âmbar da rosiglitazona em pó a 99,5% de pureza e a 75,1% para base livre para diminuir a penetraçãso de luz e evitar a degradação do produto. Preparo da rosiglitazona a 2%.

A forma farmacêutica utilizada foi uma suspensão oral com goma xantana a 0,2% (a partir de um gel de goma xantana a 2%). Optou-se por um veículo viscoso em função da insolubilidade da rosiglitazona em água. As fases do preparo da rosiglitazona estão apresentadas no QUADRO 3.

QUADRO 3

Fases do preparo da rosiglitazona

1)	Pesagem do ativo, do conservante e do gel de goma xantana.
2)	Trituração dos pós.
3)	Pesagem da glicerina para homogeneização dos ativos.
4)	Adição de água.
5)	Transferência para uma proveta graduada.
6)	Completar o volume de 100 mL de água.
7)	Verificação do potencial de Hidrogênio (pH).
8)	Transferência da suspensão para frasco âmbar tipo *pet.*

A rosiglitazona passou pelas fases em condições assépticas.

Os dados farmacotécnicos e a apresentação final da rosiglitazona estão apresentados nos QUADROS 4 e 5.

QUADRO 4

Farmacotécnica para produção de 200 mL de rosiglitazona a 2%

Rosiglitazona.....4g (não foi aplicado o fator de correção)
nipagin.....0,15% (conservante)
gel de goma xantana a 2%.....0,2% (agente suspensor)
glicerina.....10 mL (agente molhante)
água destilada e deionizada qsp.....200 mL
pH final da suspensão = 3,4 (formação de grumos em pH de 5,0)

Apresentação dos produtos envolvidos na elaboração da rosiglitazona a 2%.

QUADRO 5

Forma de apresentação da rosiglitazona administrada aos animais

Embalagem: frascos de 200 mL escuro tipo *pet*
Administração: em seringas de 1 mL
pH: 3,4
Fator de correção da rosiglitazona de 75,1% de base livre = 1,3315
Dose: 3 mg/kg/dia
Concentração da solução: 2% de rosiglitazona
Validade da suspensão: 14 dias sob refrigeração (2º - 8º C)

Dados referentes ao produto final manipulado.

Para cálculo do volume a ser aplicado, considerou-se o peso do animal, a dose de 3 mg/kg/dia para cada animal, o fator de correção e a suspensão de rosiglitazona formulada a 2%.

Portanto, como exemplo, para um animal com 2.235 g foi feito o seguinte cálculo:

2.235 X 3 X 1,3315 = 8,9278 mg de rosiglitazona.

Em cada 200 mL de solução têm-se 4.000 mg de rosiglitazona, sendo então necessários 0,446 mL da solução. O QUADRO 6 exemplifica o preparo da rosiglitazona e simula o cálculo utilizado para administrá-la em coelhos com diferentes pesos.

QUADRO 6

Preparo da rosiglitazona a 2% e exemplos dos cálculos utilizados

Base livre: 75,1% 75,1 gramas de rosiglitazona -------- 100 g do sal total 0,003 g de rosiglitazona (equivale a 3 mg de rosiglitazona) ------ x x = 0,0039947 g (quantidade de sal por kg) já aplicado fator de correção Por exemplo: Para coelhos com 3 kg: 3 x 0,0039947 = 0,0119841 g ~11,98 mg de rosiglitazona por dia Para coelhos com 2,5 kg: 2,5 x 0,0039947 = 0,0099867 gramas ~9,98 mg rosiglitazona por dia
Fator de correção da droga considerando base livre a 75,1% = 1,3315 FATOR DE CORREÇÃO= 100/75,1

Preparo da rosiglitazona a 2% e o cálculo realizado para administração em coelhos apresentando diferentes pesos.

4.1.5 Administração da rosiglitazona

A rosiglitazona, na forma de suspensão líquida, foi administrada diariamente aos coelhos do grupo 2 logo após a recuperação anestésica, a partir do cálculo do volume a ser aspirado do frasco tipo *pet* de acordo com o peso do animal, como demonstrado no item 4.1.4. Para o grupo 3, a rosiglitazona foi administrada diariamente desde o início da dieta hipercolesterolêmica até o final do experimento.

A dose aplicada foi de 3 mg/kg/dia, uso do fator de correção da droga, que é 1,3315, e uso de suspensão de rosiglitazona a 2%.

Foram observados os seguintes cuidados: conservação da suspensão em geladeira a 2-8^{o}C; seringas novas para cada animal, com o intuito de evitar a contaminação da suspensão; e conteúdo plenamente agitado por 60 segundos, antes de aspirar o exato volume a ser administrado.

Cada animal foi gentilmente imobilizado e a suspensão foi introduzida na cavidade oral através de uma seringa com capacidade de volume para 1 mL. A seringa foi introduzida pelo menos 3 cm na boca do animal para liberar a

medicação, conforme a FIG. 4.

Esse procedimento foi feito diariamente, às 9:00 horas da manhã, após a pesagem do animal, para avaliar o volume a ser administrado.

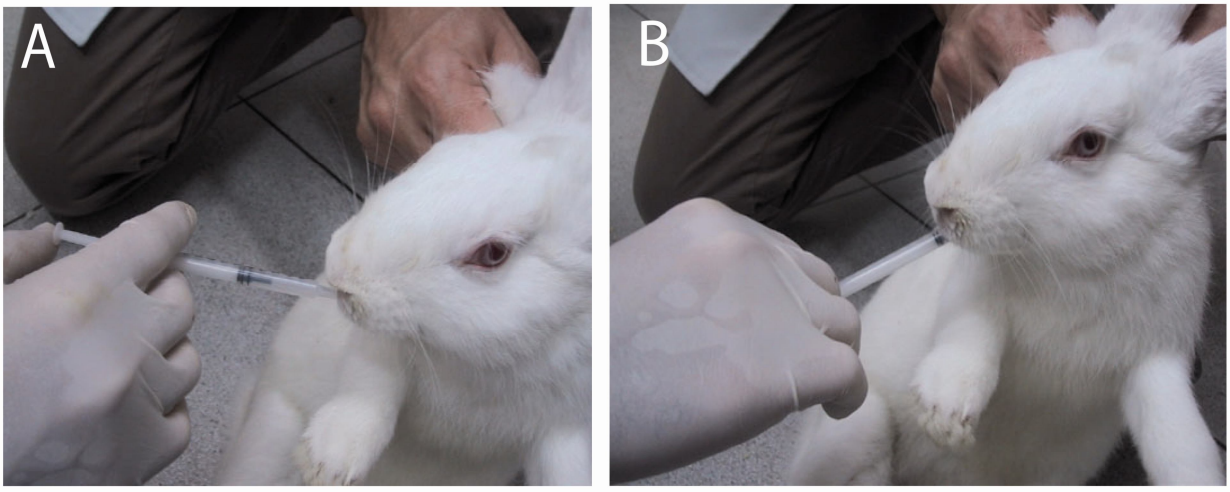


Figura 4 - Administração da rosiglitazona a 2%.

A) Introdução da seringa com capacidade para 1 mL para o início da gavagem oral.
B) Finalização do procedimento de gavagem oral com introdução de pelo menos 3 cm da seringa na boca do animal.

4.1.6 Aferições

4.1.6.1 Peso

O peso, expresso em gramas, foi avaliado diariamente em balança de precisão eletrônica e comparado no início experimento, chamado de período basal, no 14º dia e imediatamente antes da eutanásia (42º dia).

4.1.6.2 Glicemia

A glicemia, expressa em miligramas por decilitros, foi dosada pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Architec® Abbott) no início experimento, chamado de período basal, no 14º dia e imediatamente antes da eutanásia (42º dia). A unidade foi expressa em miligramas por decilitros

4.1.6.3 Lipídeos

Os colesterois total e HDL e os triglicerídeos, expressos em miligramas por decilitros, foram dosados pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Architec® Abbott) no início do experimento, chamado de período basal, no 14º dia e imediatamente antes da eutanásia (42º dia).

4.1.6.4 Análise da esclera, coroide e retina

Para as avaliações desse modelo experimental foram adotadas as aferições histológicas de forma quantitativa morfométrica, qualitativa e imuno-histoquímica.

4.1.7 Normas adotadas

Foram adotados os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO), Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1997), Nomina Anatômica Veterinaria e as normas de redação de trabalhos científicos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, dirigida para teses de Doutorado.

4.2 Procedimentos

4.2.1 Anestesia

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

Após período de cinco minutos, coletou-se sangue para avaliação

laboratorial.

4.2.2 Coleta de amostras

4.2.2.1 Sangue

No início da dieta, momento chamado basal, no 14º dia e imediatamente antes do momento da eutanásia, foram colhidos 5 mL de sangue através de punção da veia marginal auricular magna, sob anestesia geral, com injeção intramuscular de ketamina 5 mg/kg e xylazina 35 mg/kg, para as dosagens plasmáticas de lipídeos e glicemia. Soroteca com 500 microlitros de cada animal foi congelada para análises futuras.

4.2.3 Retirada dos globos oculares

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

4.3 Avaliações histopatológicas

4.3.1 Preparo das amostras

4.3.1.1 Fixação dos espécimes

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

4.3.1.2 Análise histológica

Os dois olhos de cada animal (total de 108) foram removidos e submetidos à fixação, porém somente um foi escolhido para o estudo de forma aleatória. Depois da fixação, os espécimes foram avaliados macroscopicamente, sendo feita secção coronal no nível do nervo óptico, dividindo-se os globos oculares em duas metades (superior e inferior). A metade inferior foi estocada para estudos posteriores. E a outra foi submetida a desidratação, diafanização e impregnação em parafina, com histotécnico marca Leica®, modelo TP 1020 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Para a confecção dos blocos de parafina (total de 108), utilizou-se o inclusor Leica®, modelo EG1160. Esses blocos foram cortados com micrótomo marca Leica®, modelo RM2145, a 5 µ, para obtenção dos cortes histológicos (total de 108). Os cortes foram pescados em lâmina de vidro com albumina, corados com hematoxilina-eosina e montados com lamínula de vidro de 24 x 90 mm Entellan, Merck® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As 108 lâminas coradas em hematoxilina-eosina foram analisadas sob o ponto de vista morfológico qualitativo, sendo selecionados 54 cortes histológicos, um para cada animal do estudo, com qualidade técnica adequada para a realização da análise quantitativa.

4.3.1.3 Análise histomorfométrica quantitativa da esclera e coroide

Para a análise quantitativa da coroide foram avaliados os cortes corados em hematoxilina-eosina previamente selecionados. Com a ajuda da objetiva de 4x e caneta de retroprojeção azul, o globo ocular hemisseccionado foi dividido, manualmente, em 10 segmentos iguais (de *pars* plana a *pars* plana contralateral). A seguir, capturou-se uma imagem por segmento (total de 10 imagens capturadas em cada um dos 54 olhos analisados) com microscópio Olympus BX50 (Olympus, Tokyo, Japão) acoplado à câmera Sony (Sony Corporation, Tokyo, Japão) e *software* Image Proplus® (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, EUA) (FIG. 5).

Figura 5 – Resumo do sistema para aquisição das imagens.

Microscópio Olympus® bx 50 com câmara Sony® e programa para morfometria Image Proplus 4,5®.

Em cada imagem capturada foram realizadas quatro medidas morfométricas lineares, no *software* Image Proplus®, para avaliar a espessura da coroide e da esclera nos 10 segmentos (40 medidas em cada uma das 54 lâminas avaliadas). Finalmente, foram realizadas as médias das quatro medidas de cada um dos 10 segmentos em cada um dos 54 espécimes analisados e, posteriormente, para efeitos de análise estatística, os 10 segmentos foram agrupados em duas regiões: próxima do disco óptico (segmentos A e B), denominada região posterior; e mais próxima da *pars* plana (zonas C, D e E), denominada região periférica (FIG. 6). A unidade de medida foi expressa em micrômetro.

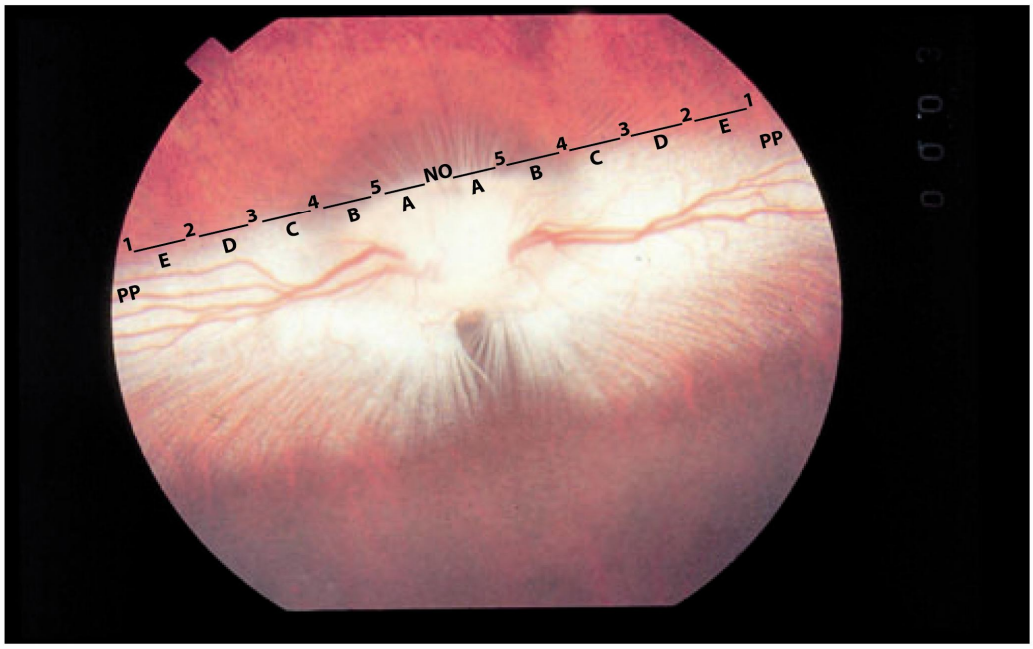


Figura 6 – Esquema dos locais de mensuração morfométrica da esclera e da coroide.

PP- *Pars* plana; NOt- Nervo óptico; Zonas A,B,C,D,E.

4.3.1.4 Análise imuno-histoquímica da retina

Os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados, sendo feito posteriormente o bloqueio da peroxidase endógena. Foram lavados em água deionizada e incubados em câmara úmida a 95ºC por 20 minutos para recuperação antigênica. Novo bloqueio da peroxidase endógena foi realizado. Os cortes foram cobertos com anticorpo primário monoclonal produzido em camundongo, denominado calretinina, da marca Dako®, clone DAK CALRET 1 (diluição *envision* 1:200). Outro anticorpo primário monoclonal utilizado foi o GFAP, também produzido em camundongo, da marca Dako®, sendo o clone GF2 (diluição 1:300). Os espécimes foram incubados em uma câmara umidificada selada por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram recobertos com anticorpo secundário, polímero marcado-HRP anticamundongo *Envision® System* (DakoCytomation, Inc., Carpinteria, EUA) e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Foram, então, submetidos ao gotejamento de substrato misto recém-preparado DAB (DakoCytomation, Inc., CA, EUA). E novamente

foram incubados por três a cinco minutos. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer e depois montados.

Controles positivos e negativos foram usados em todas as marcações e as lâminas foram primeiramente analisadas por um observador, sem conhecimento prévio do grupo de identificação (de maneira cega). Nessa análise foi anotada a existência ou não de positividade nos dois marcadores escolhidos (anticalretinina e GFAP).

Nos casos em que se constatou positividade para o marcador anticalretinina, foram feitas duas análises quantitativas. Na primeira, foram contadas todas as células ganglionares positivas em cinco campos consecutivos, com objetiva de 40x em microscópio de cinco cabeças BX50 Olympus®. Na segunda análise quantitativa, foram marcadas as áreas positivas pelo método da morfometria de cores. Esse método consistiu em analisar a área da reação positiva. Para tanto, foram capturadas imagens de 10 campos consecutivos, em objetiva de 40x, com câmera Olympus BX50, modelo DXC-107A, e *software* Image Pró-plus. O *software* permitiu que as áreas positivas fossem selecionadas e coloridas por um observador e depois calculou automaticamente os dados de área da reação positiva. Esses dados foram enviados ao programa *Microsoft Excel* (Redmond, WA) em forma de planilha, para análise estatística. A variável área total refere-se à somatória de todas as áreas positivas em cada um dos 10 campos analisados. A unidade de medida foi expressa em micrômetro ao quadrado. Foram considerados positivos ao anticorpo anticalretinina (CR) as células e elementos celulares que adquiriram coloração castanha.

4.4 Análise estatística

Para a comparação dos grupos em relação às variáveis do estudo que atenderam a condição de normalidade, foi usada a análise de variância com um fator (Análise de Variância - ANOVA) e o teste LSD (Método da diferença mínima significativa) para as comparações múltiplas. As variáveis esclera e coroide foram submetidas à transformação logarítmica. Para a comparação dos grupos em relação às variáveis que não atenderam à condição de normalidade, a

comparação entre os grupos foi feita usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Valores de $p<0,05$ indicaram significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Peso e variáveis laboratoriais

Para cada uma das variáveis do controle metabólico, testou-se a hipótese nula de que os resultados eram iguais para os quatro grupos *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tinha resultados diferentes dos demais.

Na TAB. 1 observam-se as variáveis: peso, glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos no momento basal. Não havia diferenças significativas entre os grupos em relação aos níveis de glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos. Porém, ressaltou-se diferença significativa em relação à variável peso entre os grupos. A comparação dos grupos dois a dois demonstrou significativo aumento do peso do G1 em relação ao GC ($p=0,009$) e ao G2 ($p=0,003$).

TABELA 1

Peso (em gramas) e variáveis laboratoriais (em miligramas por decilitros) no momento basal

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p
Peso	GC	6	2359,67	2318,5	1973	2813	361,16	
	G1	12	2804,75	2789	2300	3350	344,60	
	G2	18	2426,61	2400	1900	3016	311,40	
	G3	18	2593,78	2556	2034	3304	322,17	**0,012** [a]
Glicose	GC	6	107,33	106	92	130	13,88	
	G1	12	123,00	123,5	92	148	17,05	
	G2	18	122,11	126	80	149	18,49	
	G3	18	116,50	114,5	99	141	11,58	0,167 [a]
Colest_T	GC	6	44,50	42,5	29	67	15,04	
	G1	12	41,50	39	24	63	12,81	
	G2	18	48,67	51	22	77	18,50	
	G3	18	39,50	38,5	18	69	13,59	0,337 [a]
HDL	GC	6	22,33	21,5	17	29	4,27	
	G1	12	24,08	24,5	17	32	5,21	
	G2	18	23,56	23,5	14	40	7,29	
	G3	18	20,72	19	12	36	6,19	0,305 [b]
Triglicerídeo	GC	6	60,67	57,5	47	78	11,31	
	G1	12	68,25	55	40	124	28,07	
	G2	18	84,72	85,5	28	135	32,46	
	G3	18	92,11	79,5	34	228	46,37	0,119 [b]

([a]) ANOVA, p<0,05
([b]) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05.

A TAB. 2 demonstra as variáveis: peso, glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos no 14º dia.

TABELA 2

Peso (em gramas) e variáveis laboratoriais (em miligramas por decilitros) no 14º dia

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p*
Peso	GC	6	2374,17	2330	1980	2820	360,23	
	G1	12	2851,33	2788	2374	3390	332,44	
	G2	18	2548,44	2548	2014	3034	259,38	
	G3	18	2760,61	2800	2094	3360	305,87	**0,005** [a]
Glicose	GC	6	106,83	105	95	125	11,34	
	G1	12	303,00	302,5	192	435	82,32	
	G2	18	253,11	262	156	392	65,46	
	G3	18	164,11	156,5	105	263	38,29	**<0,001** [a]
Colest_T	GC	6	43,00	41,5	27	65	13,99	
	G1	12	600,25	726	165	853	258,94	
	G2	18	404,83	366,5	170	811	180,57	
	G3	18	358,50	361,5	56	762	215,43	**<0,001** [b]
HDL	GC	6	23,00	22,5	19	29	3,41	
	G1	12	24,50	25	16	30	3,94	
	G2	18	27,11	27,5	14	41	6,50	
	G3	18	48,22	48,5	6	98	23,22	**<0,001** [a]
Triglicerídeo	GC	6	60,50	58	50	75	9,69	
	G1	12	79,75	62	45	142	35,13	
	G2	18	81,44	52	30	216	60,90	
	G3	18	113,78	91	31	338	82,09	0,433 [b]

([a]) ANOVA, p<0,05
([b]) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05.

Verificou-se diferença significativa entre os grupos quanto às seguintes variáveis: peso, glicose, colesterol total e HDL. Sendo assim, para cada uma dessas variáveis foram feitas as comparações dos grupos dois a dois. Os resultados do valor de p são apresentados na TAB. 3.

TABELA 3

Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 relativos ao peso e variáveis laboratoriais no 14º dia

Grupos sob comparação	Peso Valor de p	Glicose Valor de p	Colest_t Valor de p	HDL Valor de p
GC x G1	**0,003**	**<0,001**	**<0,001**	0,834
GC x G2	0,229	**<0,001**	**<0,001**	0,543
GC x G3	**0,009**	**0,044**	**<0,001**	**<0,001**
G1 x G2	**0,010**	**0,027**	**0,030**	0,624
G1 x G3	0,426	**<0,001**	**0,006**	**<0,001**
G2 x G3	**0,041**	**<0,001**	0,474	**<0,001**

A TAB. 4 contém as variáveis peso, glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos no 42º dia (dia da eutanásia).

TABELA 4

Peso (em gramas) e variáveis laboratoriais (em miligramas por decilitros) no dia do sacrifício (42º dia)

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p*
Peso	GC	6	2383,67	2342	1990	2830	359,83	
	G1	12	3040,33	3084	2440	3734	434,60	
	G2	18	2726,22	2698	2428	3126	222,45	
	G3	18	2764,44	2793	2316	3386	266,17	**0,001** [a]
Glicose	GC	6	104,33	100	94	123	10,75	
	G1	12	169,75	160,5	108	247	49,96	
	G2	18	225,61	208	115	404	87,47	
	G3	18	235,67	235,5	77	447	79,92	**0,001** [a]
Colest_T	GC	6	42,50	41,5	28	66	13,97	
	G1	12	881,83	981	199	1046	233,16	
	G2	18	708,67	783,5	121	992	256,40	
	G3	18	684,89	665	246	1220	264,33	**<0,001** [b]
HDL	GC	6	23,33	23	19	30	3,78	
	G1	12	25,33	26,5	13	32	5,94	
	G2	18	26,72	20,5	12	65	14,79	
	G3	18	73,94	70	40	123	22,92	**<0,001** [b]
Triglicerídeo	GC	6	59,67	57,5	50	73	8,85	
	G1	12	105,75	96,5	34	213	58,08	
	G2	18	332,17	147	52	1355	442,86	
	G3	18	277,72	231	60	983	212,34	**<0,001** [b]

([a]) ANOVA, p<0,05 ([b]) Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05.

Para todas as variáveis analisadas houve diferença significativa entre os grupos. Os valores de p relativos às comparações dos grupos dois a dois estão expressos na TAB. 5.

TABELA 5

Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação ao peso e variáveis laboratoriais no 42º dia

Grupos sob comparação	Peso p	Glicose P	Colesterol p	HDL p	Triglicerídeos p
GC x G1	**<0,001**	0,079	**<0,001**	0,534	0,086
GC x G2	**0,023**	**0,001**	**<0,001**	0,995	**<0,001**
GC x G3	**0,012**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**	**<0,001**
G1 x G2	**0,009**	**0,045**	**0,016**	0,408	**0,018**
G1 x G3	**0,020**	**0,019**	**0,009**	**<0,001**	**0,001**
G2 x G3	0,712	0,681	0,802	**<0,001**	0,173

Quando os momentos foram comparados, constatou-se estabilidade em todas as variáveis do GC nos três momentos (basal, 14º dia e 42º dia). Ocorreu aumento da glicemia no G1, G2 e G3 no início do experimento até o 14º dia. A glicemia continuou a aumentar no G3 do 14º dia até a eutanásia. O colesterol total aumentou de forma acentuada nos grupos 1, 2 e 3 no momento basal até a eutanásia. A HDL do G3 teve aumento expressivo no momento basal até a eutanásia, sendo que os demais grupos mantiveram-se praticamente estáveis. Os triglicerídeos também sofreram aumento nos grupos G1, G2 e G3 no momento basal até a eutanásia.

5.2 Morfometria da esclera e coroide

Para cada uma das variáveis - esclera, coroide e complexo esclerocoroideano - testou-se a hipótese nula de que as médias eram iguais para os quatro grupos *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tinha média diferente da dos demais.

5.2.1 Morfometria da esclera

Na TAB. 6 acompanham-se os valores da morfometria da esclera nos quatro grupos.

TABELA 6

Morfometria da esclera em micrômetros

Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p*
GC	6	223,66	226,66	188,93	246,75	24,58	
G1	12	278,88	258,72	212,69	378,45	50,41	
G2	18	263,13	269,04	206,39	330,20	35,26	
G3	18	248,52	241,16	191,38	333,60	45,09	**0,044**

(*) ANOVA, p<0,05.

Como se detectou diferença significativa entre os grupos, foi realizada a comparação dois a dois. Na TAB. 7 são apresentados os valores de p dessas comparações.

TABELA 7

Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2
em relação à morfometria da esclera

Grupos sob comparação	Valor de p
GC x G1	**0,010**
GC x G2	**0,038**
GC x G3	0,207
G1 x G2	0,377
G1 x G3	0,054
G2 x G3	0,233

O GC mostrou-se significativamente mais adelgaçado que os grupos G1 e G2 (p≤0,038). O GRÁF. 1 demonstra a diferença entre os grupos.

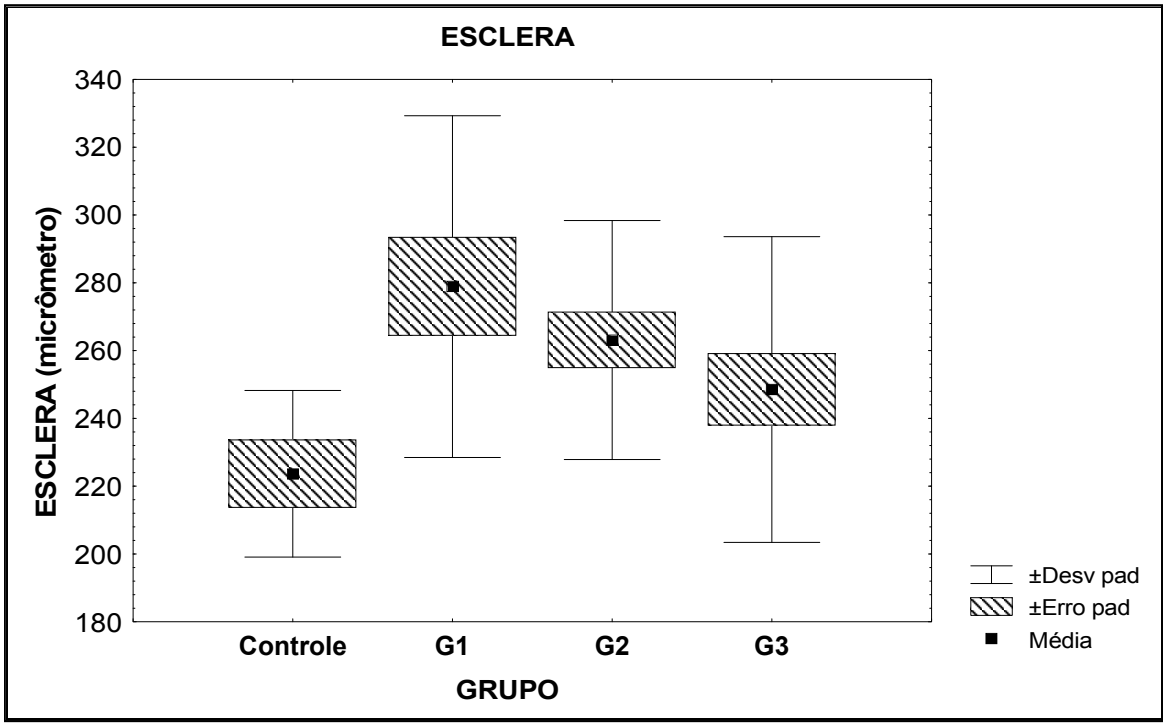


Gráfico 1 - Comparação entre os grupos relativa à morfometria da esclera.

Na FIG. 7 encontra-se acentuada quantidade de histiócitos e fibras colágenas presentes na esclera do animal do G1.

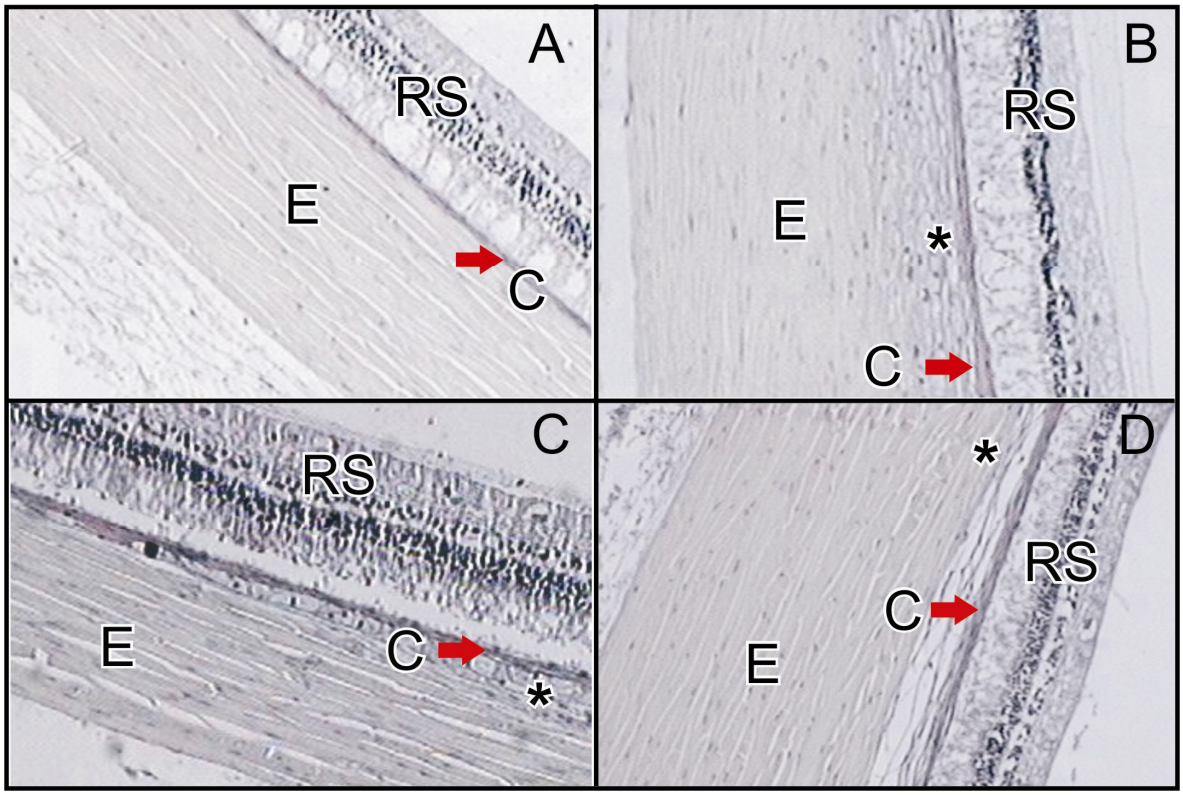


Figura 7 - Exame histopatológico da esclera e coroide nos quatro grupos para a realização da morfometria.

Histomorfometria da esclera e coroide. **A.** Complexo esclerocorioretiniano de coelho do grupo-controle apresentando raros histiócitos na esclera. A coroide (flecha vermelha) apresenta espessura regular. **B.** Complexo esclerocorioretiniano de coelho do grupo 1. A esclera é mais espessa devido a acentuado número de histiócitos e fibras colágenas. A coroide tem espessura irregular, com áreas espessadas (flecha vermelha) e áreas adelgaçadas. **C.** Complexo esclerocorioretiniano de coelho do grupo 2 com histiócitos na parede escleral. A coroide mantém sua irregularidade (flecha em vermelho). **D.** Complexo esclerocorioretiniano de coelho do grupo 3 com raros histiócitos na esclera. A coroide apresenta espessura mais regular (flecha vermelha). E= esclera; C= coroide; RS= retina sensorial. * Indica histiócitos.

5.2.2 Morfometria da coroide

A TAB. 8 mostra a morfometria da coroide nos quatro grupos.

TABELA 8

Morfometria da coróide em micrômetros

Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p*
GC	6	15,43	15,52	14,42	16,21	0,72	
G1	12	19,89	20,09	14,52	24,48	2,64	
G2	18	18,95	17,82	14,07	28,99	3,93	
G3	18	17,60	16,24	12,35	32,18	4,53	**0,038**

(*) ANOVA, p<0,05.

Como houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, foi realizada a comparação dois a dois. Na TAB. 9 comparam-se os valores de p.

TABELA 9

Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação à morfometria da coroide

Grupos sob comparação	Valor de p
GC x G1	**0,010**
GC x G2	**0,035**
GC x G3	0,223
G1 x G2	0,396
G1 x G3	**0,047**
G2 x G3	0,191

A coroide do G1 mostrou-se significativamente mais espessada que o grupo-controle e G3 (≤0,04). A espessura da coroide do G2 foi significativamente maior do que a do GC (p=0,03). O GRAF. 2 ilustra a diferença entre os grupos.

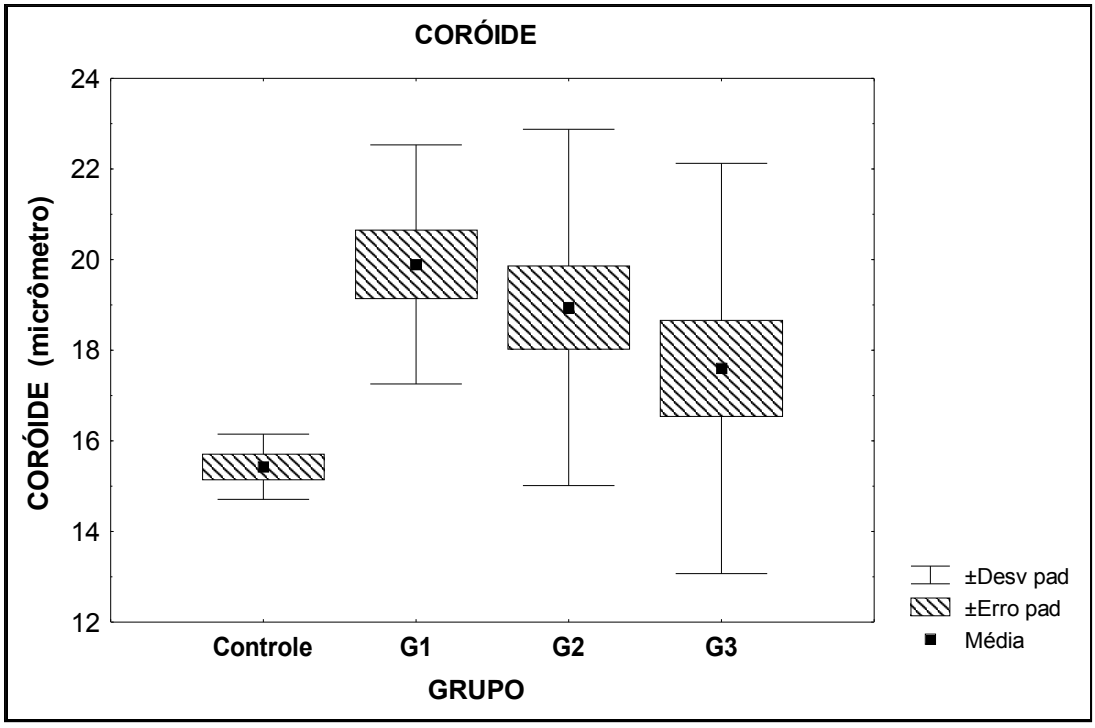


Gráfico 2 - Comparação entre os grupos relativa à morfometria da coroide.

A FIG. 7 mostra áreas irregulares de espessamento de coroide, principalmente nos grupos 1 e 2.

5.2.3 Morfometria da esclera + coroide

A morfometria da esclera e coroide nos quatro grupos pode ser observada na TAB. 10.

TABELA 10

Morfometria da esclera + coroide em micrômetros

Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p*
Controle	6	239,09	242,12	205,14	262,17	24,33	
G1	12	298,78	276,68	235,77	402,92	51,35	
G2	18	282,08	290,11	222,89	359,19	36,44	
G3	18	266,11	258,92	204,22	357,89	47,94	**0,039**

(*) ANOVA, p<0,05.

A comparação dois a dois foi feita tendo em vista que se detectou significativa diferença estatística entre os grupos. A TAB. 11 apresenta os valores de p das comparações.

TABELA 11

Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação à morfometria da esclera + coroide

Grupos sob comparação	Valor de p
GC x G1	**0,008**
GC x G2	**0,040**
GC x G3	0,191
G1 x G2	0,305
G1 x G3	**0,048**
G2 x G3	0,274

A esclera e a coroide do G1 mostraram-se significativamente mais espessadas que os grupos controle e 3 ($p \leq 0,048$). A espessura de ambas no G2 foi significativamente maior que no GC ($p=0,040$). O GRAF. 3 ilustra a diferença entre os grupos.

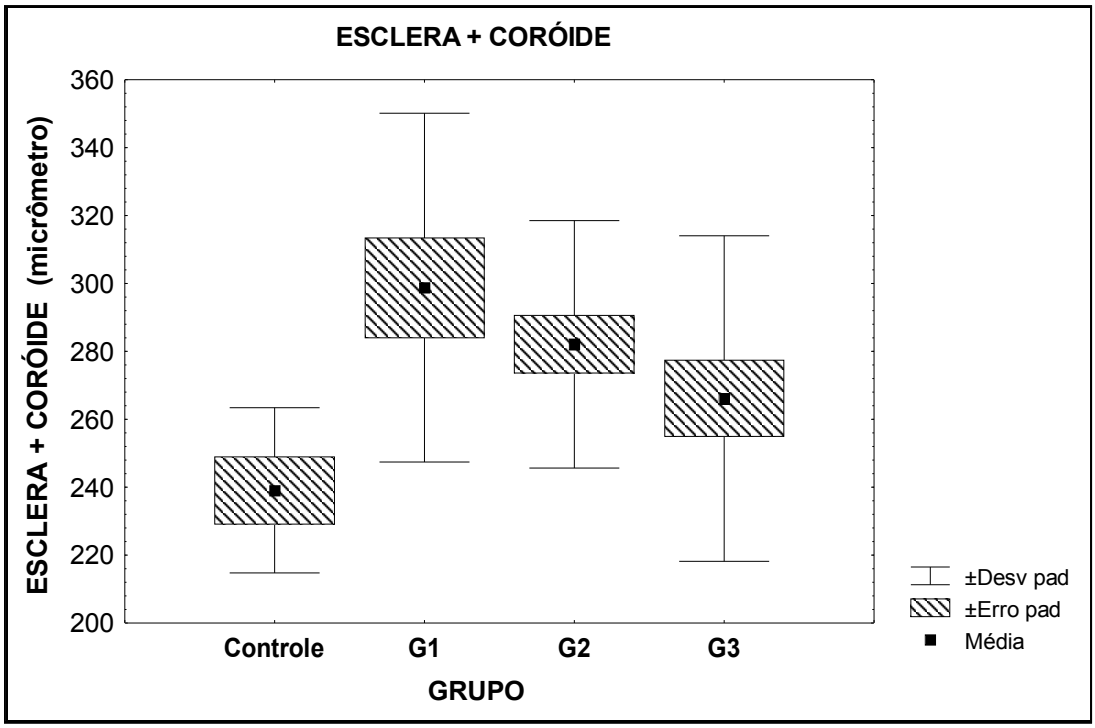


Gráfico 3 - Comparação entre os grupos relativa à morfometria da esclera + coroide.

Elevado número de histiócitos e fibras colágenas foi enfatizado na parede escleral dos animais do grupo 1, seguidos em ordem decrescente pelos grupos 2, 3 e controle (FIG. 7).

5.3 Análise da imuno-histoquímica com o anticorpo anticalretinina

5.3.1 Células ganglionares imunorreativas à anticalretinina

A TAB. 12 mostra o número de células ganglionares imunorreativas à anticalretinina, nos quatro grupos.

TABELA 12

Número de células ganglionares imunorreativas
à anticalretinina (total dos cinco campos)

Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p*
Controle	6	12,00	10,5	1	26	9,49	
G1	12	20,67	19,5	5	43	10,04	
G2	18	16,67	12	1	60	15,19	
G3	18	9,94	6,5	1	36	8,50	**0,023**

O resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%. Desta forma, houve diferença entre os quatro grupos. Na TAB. 13 são apresentados os valores de p nas comparações dos grupos 2 a 2.

TABELA 13

Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação
às células ganglionares imunorreativas à anticalretinina

Grupos comparados	Valor de p
GC e G1	0,056
GC e G2	0,495
GC e G3	0,634
G1 e G2	0,085
G1 e G3	**0,002**
G3 e G3	0,105

Poucas células ganglionares foram imunorreativas no GC. No G1, as células ganglionares imunorreativas foram vistas em número mais elevado, porém sem relevância estatística quando comparado com o GC. O G3 teve baixo número de células ganglionares imunorreativas na comparação com o grupo 1, com significância estatística (p=0,002). O GRAF. 4 mostra essa diferença entre os grupos.

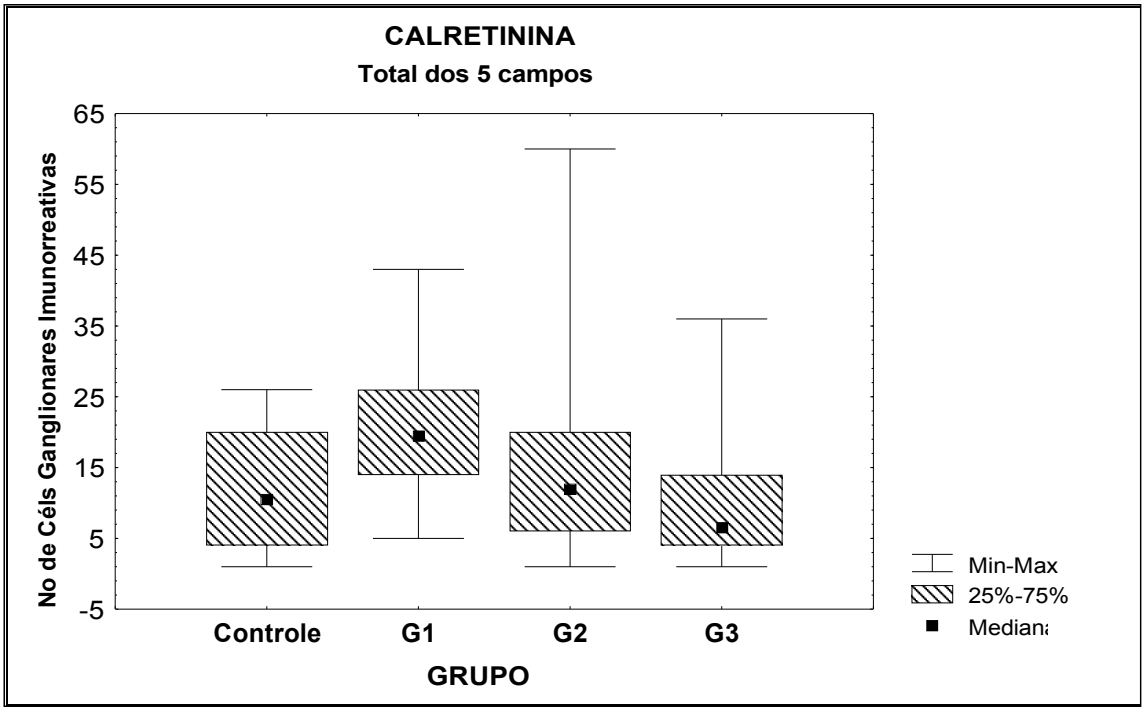


Gráfico 4 - Comparação entre os grupos relativa ao número de células ganglionares imunorreativas à anticalretinina.

Percebeu-se que algumas células ganglionares estavam deslocadas para a camada plexiforme interna e camada nuclear interna nos quatro grupos. As células imunorreativas adquiriram a cor castanha (FIG. 8).

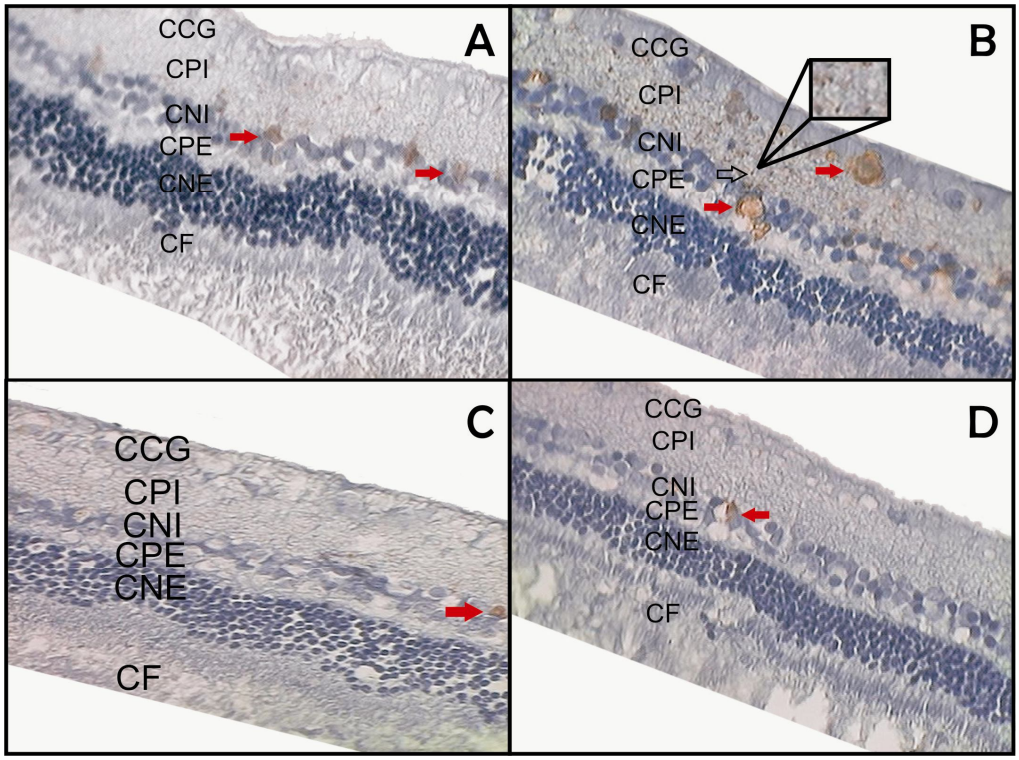


Figura 8 – Imuno-histoquímica da retina com o anticorpo anticalretinina.

Imuno-histoquímica com o anticorpo anticalretinina. **A.** Retina de coelho do grupo-controle. Algumas células ganglionares com imunorreatividade à anticalretinina estão deslocadas para as camadas plexiforme e nuclear interna (flechas vermelhas). **B.** Retina de coelho do grupo 1. Algumas células ganglionares encontram-se deslocadas para as camadas plexiforme e nuclear interna (flecha vermelha). Observa-se forte imunorreatividade de algumas dessas células. Na área em destaque, na camada plexiforme interna, há células e elementos celulares densamente imunorreativos pelo anticorpo monoclonal anticalretinina (flecha preta). **C.** Retina de coelho do grupo 2. Raras células ganglionares são imunorreativas à anticalretinina (flecha vermelha). **D.** Retina de coelho do grupo 3. Raras células ganglionares impregnam-se pela anticalretinina (flecha vermelha). CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; CF, camada de fotorreceptores.

5.3.2 Morfometria de cores com o anticorpo anticalretinina

Para esta variável testou-se a hipótese nula de que os resultados eram iguais nos quatro grupos *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tinha resultados diferentes dos demais. A TAB. 14 contém estatísticas descritivas por grupo, assim como os valores de p.

TABELA 14

Área total retiniana imunorreativa ao anticorpo anticalretiniana em micrômetros ao quadrado

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Valor de p
Área total	GC	5	98,23	94,20	30,44	139,61	43,42	
	G1	12	1479,01	1273,45	972,12	3341,89	665,73	
	G2	18	503,62	422,55	41,60	1348,31	363,34	
	G3	18	507,90	394,16	128,54	1347,84	316,24	**<0,001**

Devido à diferença significativa entre os grupos, foi realizada a comparação dois a dois. Na TAB. 15 são apresentados os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 15

Valores de p das comparações dos grupos 2 a 2 em relação à morfometria de cores com o anticorpo anticalretinina

Grupos comparados	Área média soma
GC x G1	**<0,001**
GC x G2	**0,001**
GC x G3	**0,002**
G1 x G2	**<0,001**
G1 x G3	**<0,001**
G2 x G3	0,834

O grupo-controle apresentou células e elementos celulares reativos à anticalretinina, embora com número significativamente mais baixo que os demais grupos ($p \leq 0,001$). A imunorreatividade do G1 foi marcantemente mais acentuada do que nos demais grupos ($p < 0,001$). Foi possível identificar expressivo número de células e elementos celulares imunorreativos à calretinina no G1, mesmo sem a técnica de morfometria de cores. Verificou-se também no G1 representativa imunorreatividade das camadas plexiforme interna e nuclear interna (GRÁF. 4). Não foi possível realizar tal análise em uma das lâminas do grupo-controle devido

a problemas técnicos durante a preparação. Consequentemente, somente cinco olhos do GC foram analisados com a técnica de morfometria de cores.

A diferença da imunorreatividade de células e elementos celulares entre os grupos está demonstrada no GRAF. 5.

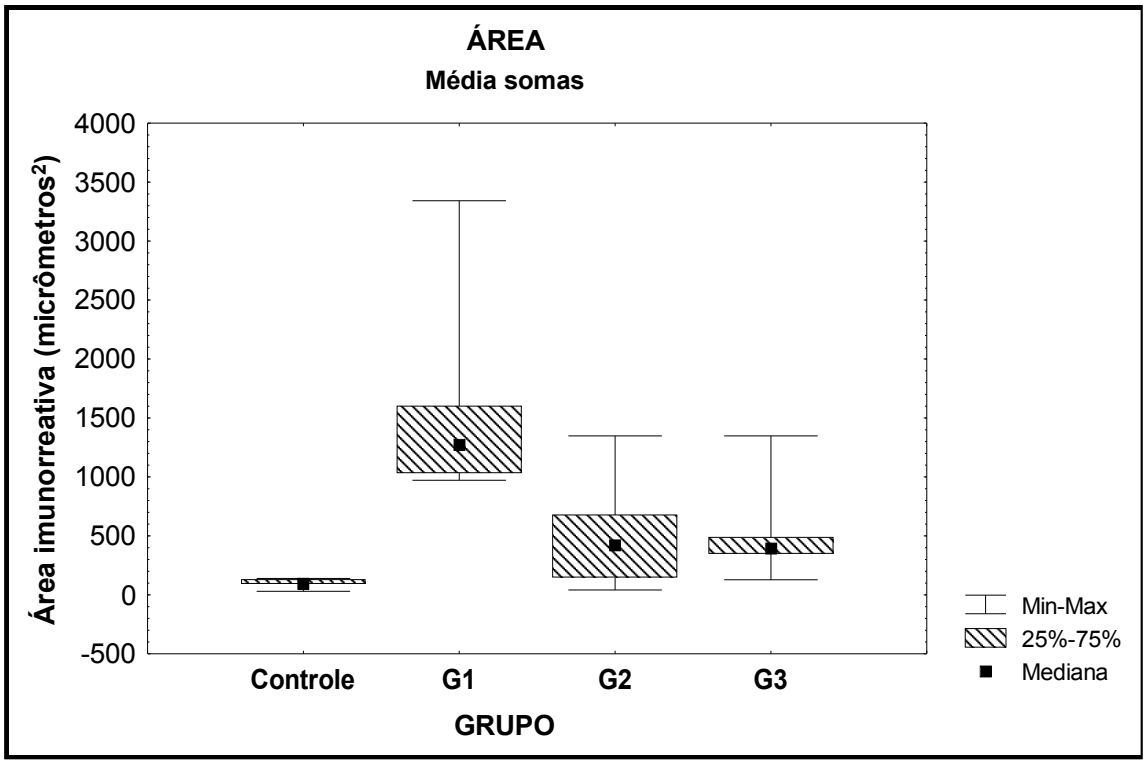


Gráfico 5 - Comparação entre os grupos relativa à área total retiniana imunorreativa à anticalretinina.

5.4 Análise da imuno-histoquímica com o anticorpo GFAP

TABELA 16

Imunorreatividade retiniana ao GFAP

Reação	Controle	G1	G2	G3
Negativa	6	12	18	18
	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Positiva	0	0	0	0
	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Total	6	12	18	18

Todos os animais, segundo a TAB. 16, tiveram reação negativa ao anticorpo GFAP. Nas comparações dos grupos controle x G3, G1 x G3 e G2 x G3 não se salientou diferença estatisticamente significativa (p=1).

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelo utilizado

Neste estudo experimental foram utilizados coelhos submetidos à dieta rica em colesterol com o objetivo de demonstrar que a hipercolesterolemia provoca anormalidades anatômicas precoces da esclera, coroide e retina. A rosiglitazona, administrada em dois momentos diferentes em coelhos hipercolesterolêmicos, teve o intuito de preservar histologicamente essas estruturas. O primeiro momento foi do grupo 2, que recebeu o agonista do PPAR gama a partir do 14º dia. O segundo momento foi o do grupo 3, que recebeu a medicação desde o início do experimento. O grupo-controle, com dieta normal para o coelho durante todo o experimento, e o grupo 1, com dieta hipercolesterolêmica durante todo o experimento, serviram de referências para comparar, pela primeira vez, os achados histopatológicos da esclera, coroide e retina provocados pela dieta rica em colesterol, no período de seis semanas, com a atenuação de eventuais anormalidades morfológicas com a administração da rosiglitazona.

Ao escolher coelhos para esta pesquisa, foram ponderadas as vantagens desse animal sobre os demais, que incluem mais disponibilidade, baixo custo (em relação a camundongos transgênicos deficientes dos receptores para o colesterol LDL ou apoliproteína E) e a caracterização genética mais definida (KANTOR *et al*., 1999; WILENSKY *et al*., 1995). Do ponto de vista arterial, a dieta hipercolesterolêmica induz rapidamente a disfunção endotelial e a resposta semelhante à aterogênese, servindo como bom modelo para as doenças cardiovasculares (POST; BORST; KUNTZ, 1994; SUN *et al*., 2000). Sob este aspecto, coelhos foram também utilizados como modelo para avaliar a resposta antiaterosclerótica dos agonistas do PPAR gama, permitindo obter informações referentes aos aspectos bioquímicos, morfológicos, imuno-histoquímicos de marcadores inflamatórios e de resposta vasodilatora (SEKI *et al*., 2005; TAO *et al*., 2003). Por isto, a utilização de coelho neste estudo ganhou preferência em relação a outros animais. Sabe-se também que níveis séricos normais de colesterol variam de 25 a 60 mg% em contraste com o ser humano, que

apresenta variação de 100 a 200 mg%. Sendo assim, o sistema metabólico do coelho pode ser facilmente sobrecarregado com simples dieta diária hipercolesterolêmica, tornando os experimentos mais viáveis e reprodutíveis (COGAN; KUWABARA, 1959; SUN *et al*., 2000). Este fato foi constatado no presente relato. O colesterol do G1 passou de 41,50 mg% para aproximadamente 600 mg% em 14 dias e, finalmente, no momento da eutanásia, chegou a aproximadamente 881 mg%. Nos grupos 2 e 3 ocorreu também significativo aumento do colesterol no momento basal até o 42º dia, em relação ao GC.

Do ponto de vista ocular, vários estudos experimentais foram realizados em coelhos com o objetivo de demonstrar que a dieta rica em colesterol provoca anormalidades da esclera, coroide e retina. Tais estudos caracterizaram-se pela administração de dieta rica em colesterol a 0,5% durante o período mínimo de seis meses (RAMÍREZ *et al*., 2006; SALAZAR *et al*., 2007; TRIVIÑO *et al*., 2006). No presente experimento, a dosagem de colesterol administrada foi mais alta que em outros relatos nas duas primeiras semanas (colesterol 1%), porém igual à dos demais estudos nas últimas quatro semanas (colesterol 0,5%). Essa dosagem de colesterol permitiu, nesta pesquisa, obter alterações da esclera, coroide e retina nesse período (seis semanas). Esse fato ganha importância em nosso meio científico, pois ficou evidenciado que as alterações na parede ocular de coelhos, assim como nas artérias (SUN *et al*., 2000), podem ser obtidas em curto espaço de tempo, facilitando os experimentos e reduzindo os custos das pesquisas.

É importante lembrar que, após a enucleação de coelhos, a retina se mantém íntegra histologicamente por até 15 minutos. Períodos superiores a este provocam anormalidades degenerativas dessa estrutura anatômica (JOHNSON; GRIERSON, 1976). Sendo assim, após a eutanásia dos animais os olhos foram removidos imediatamente e submetidos à pronta fixação, com o intuito de se obterem dados fidedignos.

A escolha da rosiglitazona como agonista do PPAR gama foi adotada pelos vários estudos experimentais envolvendo essa modalidade de droga na prevenção da aterosclerose (ALESSI *et al*., 2008; FRANÇA NETO *et al*., 2008; LEVI *et al*., 2003; LIU *et al*., 2004; MURTHY *et al*., 2005; SÁNCHEZ-HIDALGO *et al*., 2005; SOROCÉANU *et al*., 2004; TAO *et al*., 2003; YUEN *et al*., 2003).

Outro fator que influenciou nesta decisão foi o fornecimento do produto

pela empresa farmacêutica GlaxoSmithKline, responsável pela comercialização. Os trâmites burocráticos foram preenchidos para a solicitação junto à empresa no Brasil e diretamente na matriz localizada na Inglaterra. Para isto, foi enviado o projeto de pesquisa, assim como a apresentação das características dos pesquisadores e do local onde a pesquisa seria realizada. Desta forma, recebemos 15 frascos da rosiglitazona em pó, possibilitando sua preparação e utilização na forma de suspensão, com goma xantana a 0,2%, administrada aos animais por gavagem oral na dose diária de 3 mg/kg/dia, sob orientação farmacêutica especializada e de acordo com a metodologia aplicada em estudos experimentais prévios (LIU *et al*., 2004; MURTHY *et al*., 2005; SÁNCHEZ-HIDALGO *et al*., 2005; SOROCÉANU *et al*., 2004; TAO *et al*., 2003). Todas as fases de execução deste estudo contaram com a participação do investigador principal, usando critérios rígidos de padronização técnica e de aferições. Outros agonistas do PPAR gama, tais como pioglitazona e troglitazona, estão também disponíveis e podem ser usados em futuros estudos.

É importante frisar que, assim como a aterosclerose, a DMRI em humanos difere nos modelos animais. Desta forma, as respostas terapêuticas realçadas em experimento animal muitas vezes não são transponíveis para humanos devido às peculiaridades fisiopatogênicas como, por exemplos, fenômenos trombogênicos, atividade inflamatória e proliferativa do vaso, assim como características genéticas e fenotípicas (JOHNSON; GRIGGS; BADIMON, 1999; ZHANG; CHAWLA, 2004).

6.2 Fisiopatogenia da DMRI e o modelo utilizado

Acredita-se que a fase inicial da DMRI possa estar relacionada com o acúmulo de depósitos ricos em lipídios abaixo do epitélio pigmentário retiniano (EPR) (ESPINOSA-HEIDMANN *et al*., 2006; PAULEIKHOFF *et al*., 1970; SHERAIDAH *et al*., 1993). A origem desses depósitos é atribuída principalmente ao mau funcionamento das células do EPR (BAILEY *et al*., 2004; EAGLE, 1984; HOGAN, 1972; HOLZ *et al*., 1994). Essas células, após fagocitar as extremidades dos fotorreceptores, enviam restos celulares maiores que o normal para a coriocapilar. Esses fragmentos não conseguem ultrapassar a membrana de Bruch

e se depositam sobre ela, aumentando a sua espessura, reduzindo a porosidade e condutibilidade hidráulica (FISHER, 1987; MOORE; HUSSAIN; MARSHALL, 1995; RAMRATTAN *et al*., 1994; STARITA *et al*., 1996). Isto prejudica o acesso de nutrientes da coriocapilar para as células do EPR e fotorreceptores e interfere na passagem de metabólitos do EPR para a coriocapilar (FISHER, 1987).

Entretanto, a teoria proposta neste estudo baseia-se no modelo chamado vascular, similar à fisiopatologia da aterosclerose. A aterosclerose é um processo reconhecidamente inflamatório, em que o colesterol LDL deposita-se na íntima da parede vascular, levando à perda da elasticidade arteriolar. Na esclera, o acúmulo de lipídios provoca aumento da resistência pós-capilar da rede vascular da coroide, situada entre a parede escleral progressivamente enrijecida e o conteúdo não-compressível do globo (BROEKHUYSE, 1975; FRIEDMAN, 1997; FRIEDMAN *et al*., 1995). A diminuição do fluxo sanguíneo da coroide e o aumento da resistência tendem a elevar a pressão hidrostática da coriocapilar, aumentando o vazamento e a deposição de proteínas extracelulares e lipídios, particularmente no polo posterior, formando depósitos basais na membrana de Bruch e drusas. Tais alterações são consideradas manifestações iniciais da DMRI (AMBATI *et al*., 2003; FRIEDMAN *et al*., 1995). Na década de 80, após estudar o coeficiente de rigidez escleral de 29 pacientes com DMRI, essa teoria foi solidificada (FRIEDMAN *et al*., 1989). A partir desses estudos, mais atenção foi dada ao componente escleral na gênese da DMRI. Na década de 90, um relato demonstrou, por meio de ecodoppler colorido, diminuição da velocidade sanguínea e aumento da pulsação da artéria central da retina e das artérias ciliares posteriores curtas de pacientes que apresentavam DMRI (FRIEDMAN *et al*., 1995).

Outro estudo, realizado na mesma década, avaliou o fluxo sanguíneo coroideano na região foveolar. Foi utilizada a dopplerfluxometria a *laser* para demonstrar que o fluxo sanguíneo na região foveolar em pacientes com DMRI era menor que no grupo-controle. Esse efeito foi atribuído principalmente à diminuição do volume sanguíneo (GRUNWALD *et al*., 1998). Esses estudos salientaram a diminuição do fluxo sanguíneo da coroide em pacientes com DMRI, sugerindo etiologia isquêmica no desenvolvimento dessa doença.

É importante ressaltar que existem vários relatos que constataram

angiograficamente o comprometimento da perfusão coroideana em pacientes com tal doença (BÖKER; FANG; STEINMETZ, 1993; CHEN *et al*., 1992; PAULEIKHOFF *et al*., 1990; SARKS; SARKS; KILLINGSWORTH, 1988). Da mesma forma, estudo morfométrico mostrou que a senescência e a DMRI provocam espessamento da membrana de Bruch, diminuição da espessura da coriocapilar, do diâmetro dos vasos da coriocapilar e da espessura da coroide (RAMRATTAN *et al*., 1994). Foi sugerido que essas alterações poderiam ser secundárias ao espessamento escleral (FRIEDMAN, 2000).

Pesquisas posteriores em olhos de coelhos surgiram contribuindo para melhor compreensão dessa doença. Comprovou-se que a dieta rica em colesterol produz alterações em todas as camadas retinianas, aumento da espessura da membrana de Bruch, corpos densos no citoplasma do EPR, entre outras. Concluiu-se que o excesso de colesterol provoca mudanças ultraestruturais na retina de coelhos, similares àquelas da DMRI humana (TRIVIÑO *et al*., 2006). Outro estudo experimental observou que gotículas de colesterol na supracoroide comprimem as camadas vasculares e provocam hipertrofia das células endoteliais e musculares lisas vasculares, sugerindo que a dieta rica em colesterol interfere na perfusão sanguínea (SALAZAR *et al*., 2007). As FIG. 9 e 10 esquematizam a sequência de eventos que ocorrem após a deposição de lipídios na esclera e membrana de Bruch.

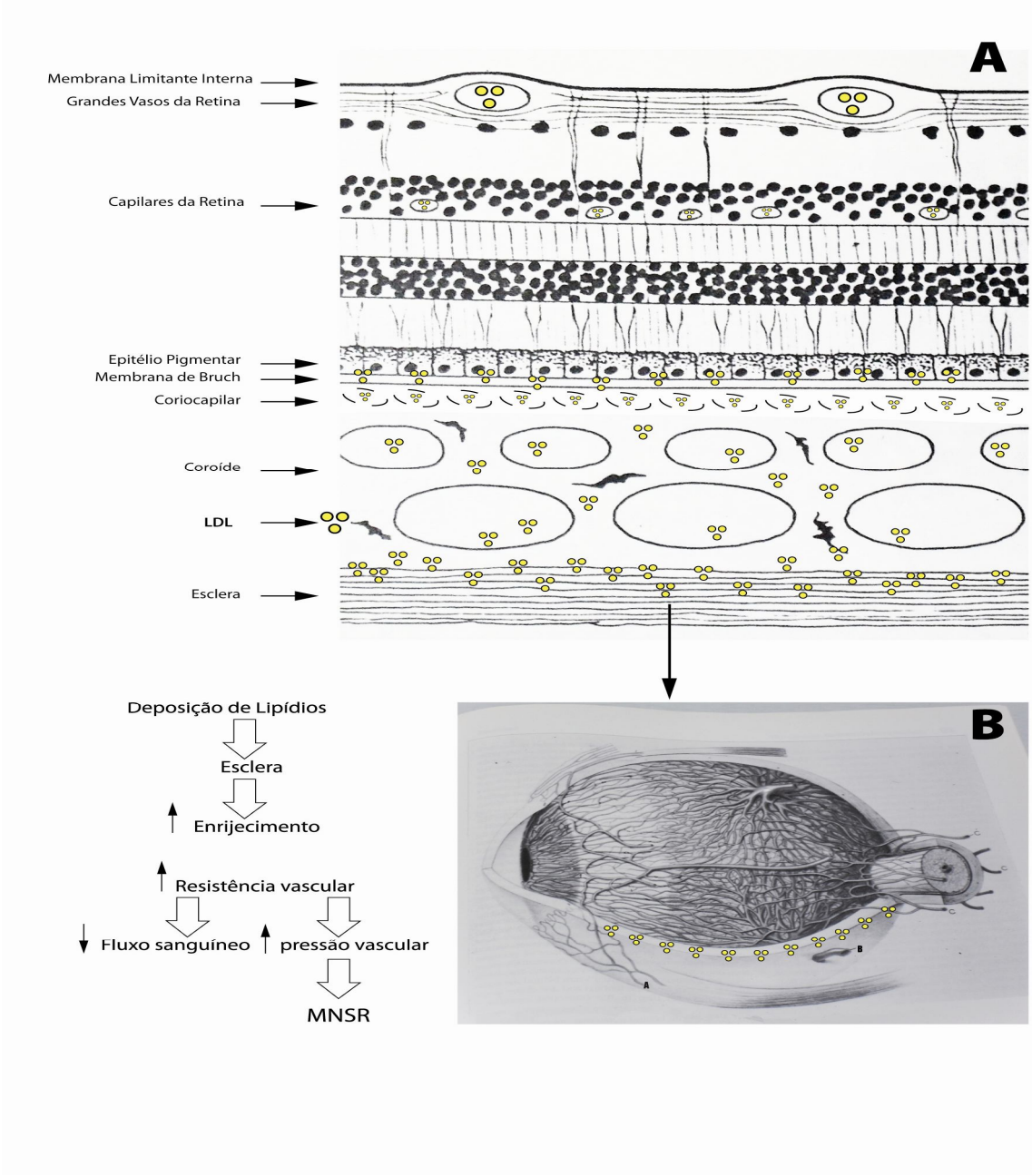


Figura 9 - Desenho esquemático demonstrando a fisiopatogênia da DMRI a partir do enrijecimento da parede escleral provocado pelos depósitos de lipídios.

A fotografia A demonstra a presença de LDL nas várias estruturas oculares. A provável migração de LDL dos vasos da coriocapilar para a esclera pode ser responsável pela atração de monócitos e formação de fibras colágenas, provocando aumento de espessura e enrijecimento escleral. A fotografia B ressalta a LDL na parede escleral. O enrijecimento da esclera pode alterar o fluxo sanguíneo e pressão vascular provocando a DMRI. Ao lado da fotografia B, observa-se um esquema fisiopatogênico da DMRI proposto por Friedman (2000). Figura B - Título da fotografia: “Os vasos sanguíneos da úvea” . Fonte: Hogan, Alvarado e Weddell (1971).

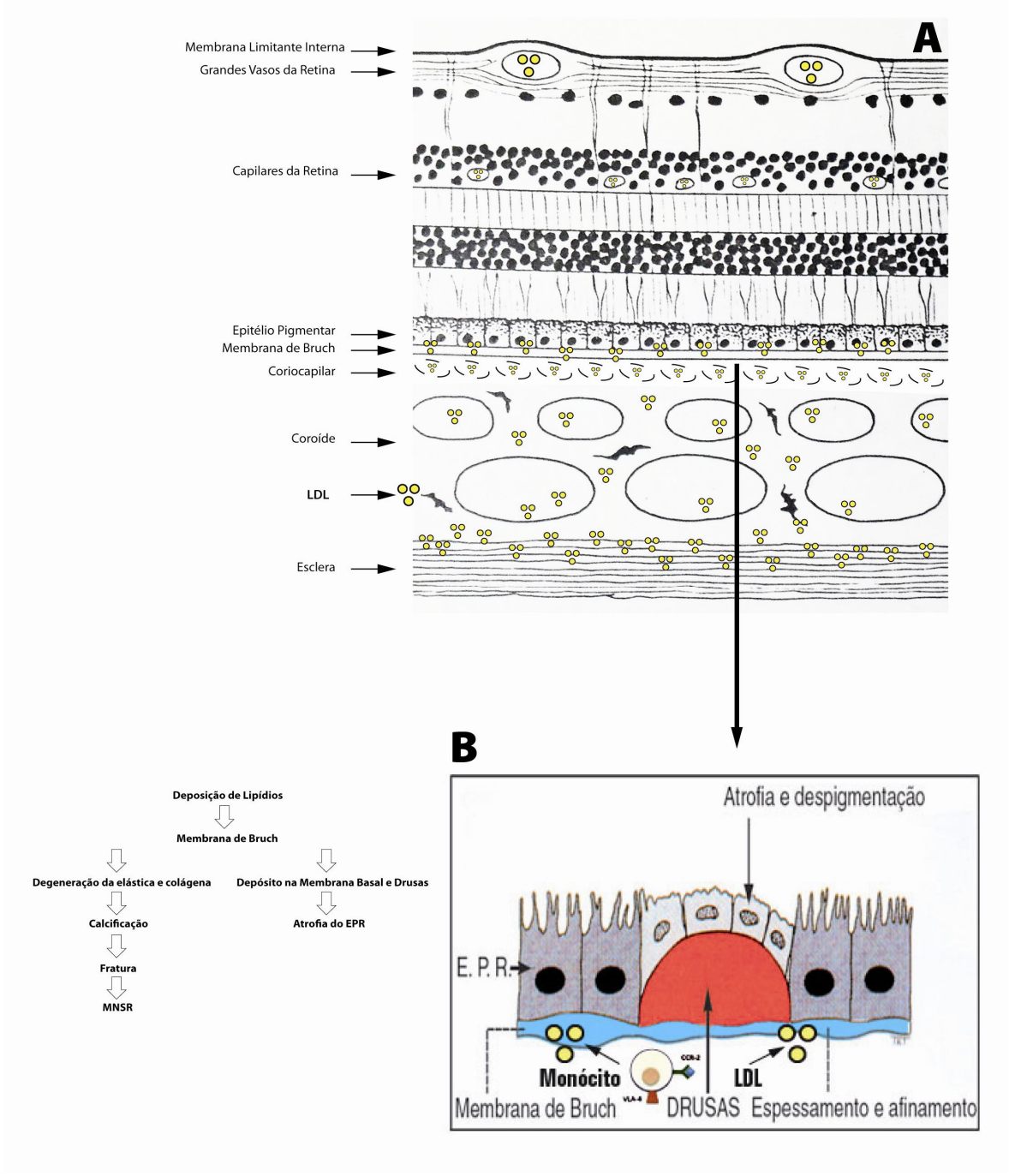


Figura 10 - Desenho esquemático mostrando lipídios na membrana de Bruch, responsável pela formação de depósitos na membrana basal e drusas.

A fotografia A demonstra LDL nas várias estruturas oculares. A LDL proveniente da coriocapilar pode se depositar na membrana de Bruch. Na fotografia B observam-se áreas de espessamento e adelgaçamento da membrana de Bruch, assim como formação de drusa, secundários à presença de LDL nessa estrutura anatômica. Observam-se também monócitos que são atraídos pela LDL. Ao lado da fotografia B observa-se esquema proposto por Friedman (2000), demonstrando o mecanismo fisiopatogênico da DMRI a partir da deposição de lipídios na membrana de Bruch.

EPR. Epitélio pigmentar da retina.

Desta forma, esses estudos serviram de suporte para avaliar-se aqui as alterações precoces na esclera, coroide e retina provocadas pela dieta rica em colesterol, assim como eventual atenuação dessas anormalidades pelo uso de rosiglitazona.

6.3 Peso e variáveis laboratoriais

No momento do sacrifício, registrou-se aumento do peso dos animais dos grupos 1, 2 e 3 em relação ao início do experimento. Já foi demonstrado que a ativação do PPAR gama favorece o ganho de peso em humanos e em modelo animal (KELLY *et al*., 1999; PERSHADSINGH, 2004, SOROCÉANU *et al.*, 2004). Embora parte desse ganho possa ser atribuída à retenção de líquido, muitos autores sugerem haver aumento da massa de tecido adiposo (PICARD; AUWERX, 2002), o que explica tal resultado.

Foi constatado significativo aumento da glicemia nos grupos 2 e 3 em relação ao controle. Estudos experimentais referiram que os ativadores do PPAR gama não afetam o nível glicêmico na hiperglicemia induzida pela dieta rica em colesterol (CLAUDEL *et al*., 2001; COLLINS *et al*., 2001; LEVI *et al*., 2003). Outra pesquisa reportou resultados similares ao nosso, cuja glicemia apresentou-se elevada no grupo de coelhos hipercolesterolêmicos tratados com agonistas do PPAR e não tratados (SEKI *et al*., 2005).

Aumento da concentração plasmática de LDL já foi descrito em pacientes diabéticos tratados com rosiglitazona (FONSECA *et al*., 2000; GOLDBERG *et al*., 2005; NISSEN; WOLSKI, 2007). A rosiglitazona reduziu significativamente as placas ateromatosas na aorta de camundongos apoE deficientes, diabéticos e não-diabéticos, segundo Levi *et al*. (2003), que relataram aumento do colesterol a despeito do uso do agonista do PPAR gama. O uso de troglitazona também não foi efetivo em reduzir o colesterol total em camundongos geneticamente modificados que receberam dieta altamente gordurosa (COLLINS *et al*., 2001). A elevação do colesterol total observado nessas investigações, inclusive na presente, com o uso da glitazona, provavelmente é consequência da hidrólise intensificada mediada pelo PPAR gama, de lipoproteínas ricas em triglicerídeos

circulantes (PICARD; AUWERX, 2002). A rosiglitazona também favorece o aumento da HDL (CHIQUETTE; RAMIREZ; DEFRONZO, 2004). Desta forma, era esperado que os animais dos grupos 2 e 3 tivessem o colesterol total elevado no momento da eutanásia.

Houve expressivo aumento da HDL no grupo 3, que recebeu rosiglitazona desde o início da pesquisa. Metanálise envolvendo 23 avaliações em pacientes com diabetes *melittus* tipo 2, randomizados e controlados com placebo, objetivou comparar os efeitos da pioglitazona com a rosiglitazona. Ambas as drogas provocaram elevação da concentração plasmática de HDL (CHIQUETTE; RAMIREZ; DEFRONZO, 2004; GOLDBERG *et al*., 2005).

O aumento significativo da concentração plasmática de triglicerídeos detectado nos grupos 2 e 3 em relação ao grupo-controle foi produzido pela dieta rica em colesterol. Em outros trabalhos identificou-se aumento de triglicerídeos em animais que receberam dieta rica em colesterol e naqueles com dieta rica em colesterol tratados com agonista do PPAR (CLAUDEL *et al*., 2001; COLLINS *et al*., 2001, LEVI *et al*., 2003). Estudo clínico mostrou que a pioglitazona diminui a concentração de triglicerídeos enquanto a rosiglitazona aumenta (GOLDBERG *et al*., 2005). Sendo assim, o aumento sérico de triglicerídeos ocorrido nos grupos que receberam rosiglitazona coincide com dados da literatura.

6.4 Aspectos histopatológicos da esclera, coroide e retina

A espessura da supracoróide está aumentada em coelhos hipercolesterolêmicos devido à abundância de fibras colágenas (SALAZAR *et al*., 2007). No presente estudo, o G1 apresentou significativo aumento da espessura da esclera e coroide em relação ao GC. Tal resultado já foi relatado previamente (TORRES *et al*., 2009a). Esse aumento da espessura foi relacionado diretamente com a elevação de histiócitos e fibras colágenas, corroborando achados de outros estudos (QUEIROZ; VIANA; SILVA, 1958; SALAZAR *et al*., 2007).

Os agonistas do PPAR gama promovem aumento da expressão da superfície celular de CD36, que está relacionado com a absorção de LDL oxidada pelos macrófagos (CHAWLA *et al*., 2001b; TONTONOZ *et al*., 1998). Portanto, a

rosiglitazona pode ter aumentado o número de histiócitos na coroide e esclera dos animais pertencentes aos grupos 2 e 3. Porém, houve redução não-significativa do espessamento do complexo esclerocoroideano no G2 (p=0,305) e significativa no G3 (p= 0,048), comparados com o G1. Esse fato pode estar relacionado com o possível estímulo ao efluxo de colesterol promovido pela rosiglitazona. Sabe-se que esse agonista do PPAR gama aumenta a expressão do SR-BI e ABCA1, elevando, consequentemente, o nível plasmático da HDL (CHAWLA *et al*., 2001c; CHINETTI *et al*., 2000 e 2001). Esses componentes estão envolvidos no transporte reverso do colesterol (RADER, 2003). Assim, a ativação do PPAR gama pode ter estimulado o influxo e o efluxo de lipídios dos macrófagos da esclera e coroide, tornando essas estruturas mais adelgaçadas nos grupos 2 e 3 em relação ao grupo 1.

A redução de histiócitos na esclera e coroide observada nos grupos 2 e 3 em relação ao grupo 1 também pode ter relação com eventual apoptose de macrófagos provocada pela rosiglitazona (CHINETTI *et al*., 1998). Outra possibilidade que poderia explicar tal resultado é a atenuação da expressão de genes inflamatórios provocada pelo agonista do PPAR gama (ZHANG; CHAWLA, 2004), reduzindo, consequentemente, o recrutamento de macrófagos para a esclera e coroide dos animais que receberam o agonista do PPAR gama (SEKI *et al*., 2005). O efeito da rosiglitazona no complexo esclerocoroideano em coelhos já foi relatado previamente pelo nosso grupo (TORRES *et al*., 2009b).

No presente estudo, o anticorpo monoclonal anticalretinina foi usado para detectar as alterações precoces das células neuronais retinianas induzidas pelo aumento do colesterol sérico. Calretinina é uma proteína ligada ao cálcio 31.5 Kda (CaBPs), pertencente à superfamília EF-*hand*. É considerada uma proteína predominantemente citosólica, embora possa ser encontrada também no núcleo celular (DECHESNE *et al*., 1991). Alguns autores atribuem à calretinina o papel de tamponador de íons cálcio, sugerindo função neuroprotetora (JANDE; MALER; LAWSON, 1981; VOGT; WERUAGA-PRIETO; CELIO, 1996). Por outro lado, algumas pesquisas sugerem que a CR não exerce tal função (MÖCKEL; FISCHER, 1994). Entretanto, a CR pode ser considerada sensora intracelular de íons cálcio (BILLING-MARCZAK; KUZNICKI, 1999). Esse anticorpo monoclonal já foi utilizado para avaliar as células neuronais retinianas em coelhos sadios

(VÖLGYI *et al*., 1997). No presente estudo, foi realizada a análise do número de células ganglionares imunorreativas ao anticorpo monoclonal anticalretinina.

É importante ressaltar que a perda desse tipo celular já foi demonstrada na DMRI humana (RAMÍREZ *et al.*, 1996) e correlacionada com o desequilíbrio da homeostase de Ca (2++) (ONG *et al*., 2001). Coelhos do G1 exibiram número mais elevado de células imunorreativas que o grupo-controle, porém sem significância estatística (p=0,056), indicando possível tendência dessas células a sofrimento no grupo de coelhos hipercolesterolêmicos. No G3, houve significativa diminuição no número de células ganglionares imunorreativas à anticalretinina em relação ao G1 (p=0,002), indicando que a rosiglitazona tem o potencial de preservar tais células. Por outro lado, a análise feita com a técnica de morfometria de cores, na qual todas as células e elementos celulares imunorreativos foram identificados, encontrou significativo aumento da imunorreatividade do grupo 1 em relação ao GC (p<0,001). Nos grupos 2 e 3, que receberam rosiglitazona, houve significativa redução da imnuorreatividade das células e elementos celulares à anticalretinina em relação ao G1 (p<0,001). Isso pode ser atribuído à melhor perfusão sanguínea da retina sensorial dos animais dos grupos 2 e 3, cujo espessamento do complexo esclerocoroideano foi menor que no grupo 1.

Outra hipótese é de que as glitazonas provocam apoptose de macrófagos ou histiócitos (CHINETTI *et al*., 1998). Sabe-se que essas células secretam espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias, matrix metaloproteinase e fator tecidual (ROBERTS *et al*., 2003), que podem provocar dano neuronal retiniano. Além disso, já se evidenciou que a ativação do PPAR gama inibe a produção de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina-6 (IL-6) (ALJADA *et al*., 2001; BERGER *et al*., 2003), assim como atenua o fator de atividade de transcrição (Nf-KB) em monócitos ativados, reduzindo subsequentemente a expressão da forma induzível do óxido nítrico sintase, gelatinase B (MMP-9) e *scavenger receptor A* (RICOTE *et al*., 1998b; TAO *et al*., 2003). Destaca-se que o aumento da expressão do iNOS é citotóxico, podendo levar a célula neuronal retiniana à apoptose (YÜCEL *et al*., 2005). Desta forma, o menor número de histiócitos observado na esclera e coroide dos grupos 2 e 3 pode ter contribuído para a preservação do tecido retiniano daqueles animais. Outro aspecto é que as glitazonas também induzem aumento da HDL

(CHINETTI *et al*., 2001), que promove o transporte reverso do colesterol e exerce efeito antioxidante e anti-inflamatório (ASSMANN; NOFER, 2003). No presente estudo, o aumento significativo da HDL sérica no G3, em relação aos outros grupos ($p<0,001$), pode ter sido responsável pela diminuição do complexo esclerocoroideano e preservação das células neuronais. A existência de cálcio dentro das células retinianas dos grupos hipercolestererolêmicos pode ser explicada também pela interferência na produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) provocada pelo aumento do colesterol sérico (RISÉ *et al*., 2004; VREUGDENHIL *et al*., 1996). Em muitas espécies, dietas deficientes de ômega -3 ocasionaram diminuição do ácido docosahexanoico (DHA) no cérebro e retina, provocando dano neural e comprometimento da função visual (PUSKÁS *et al*., 2004). A diminuição de PUFAs provoca aumento da fragilidade e permeabilidade das membranas celulares, o que supostamente causaria influxo excessivo de íons Ca++ nas células retinianas do G1.

O anticorpo monoclonal anticalretinina já foi usado para estudar anormalidades retinianas em camundongos geneticamente modificados, com deficiência de apolipoproteína E, submetidos à dieta hipercolesterolêmica por 25 semanas. Detectou-se significativa diminuição ou ausência de imunorreatividade das células retinianas nesses animais. Tal resultado foi atribuído à apoptose ou morte celular causada pelo aumento crônico do colesterol sérico (ONG *et al*., 2001). No presente estudo, os resultados foram opostos. O G1 informou significativa imunorreatividade à anticalretinina em relação ao GC ($p<0,001$).

Enfatiza-se que em todas as avaliações realizadas até a presente data a dieta rica em colesterol foi administrada no mínimo por seis meses (MICELI *et al*., 2000; ONG *et al*., 2001; RAMÍREZ *et al*., 2006; SALAZAR *et al*., 2007; TRIVIÑO *et al*., 2006; YÜCEL *et al*., 2005). Esse tempo permitiu aos pesquisadores detectar claramente as anormalidades morfológicas da esclera e coroide, enquanto que apotose, morte da célula neuronal e gliose reativa foram referidas no tecido retiniano. No presente estudo, a detecção do cálcio intracelular foi fundamental, pois o tempo de hipercolesterolemia induzida foi muito mais curto (seis semanas). Logo, somente alterações iniciais, vinculadas à entrada de cálcio na célula, poderiam comprovar o dano retiniano ocasionado pela elevação do colesterol sérico. Em coelhos normais, somente células ganglionares, amácrinas

e algumas células bipolares são imunorreativas à anticalretinina (VÖLGYI *et al*., 1997). Consequentemente, o aumento da imunorreatividade a esse anticorpo preconiza início de sofrimento retiniano induzido pela hipercolesterolemia.

No presente modelo, foi observada a vigência de íons cálcio dentro das células neuronais retinianas, porém não ocorreu morte celular seguida de gliose. Essa constatação pode explicar a negatividade do GFAP em todos os grupos. Esperava-se, nos grupos G2 e G3, ausência de imunorreatividade ao GFAP, devido ao uso do agonista do PPAR gama. Acreditava-se, também, que se obteria imunoreatividade ao GFAP nos animais do G1, devido à administração da dieta rica em colesterol sem o tratamento com a rosiglitazona. Surpreendentemente, o resultado também foi negativo nos animais desse grupo. Provavelmente, o período de hipercolesterolemia induzida (seis semanas) foi insuficiente para induzir morte celular retiniana, não se verificando, portanto, a formação de tecido glial. Em outros estudos nos quais a hipercolesterolemia proporcionou positividade ao GFAP para a glia de Müller e tornou as células amácrinas mais imunorreativas, o período de exposição ao colesterol foi de, no mínimo, oito meses (RAMÍREZ *et al*., 2006; TRIVIÑO *et al*., 2006).

Os resultados da avaliação imuno-histoquímica da retina sensorial de coelhos submetidos à dieta rica em colesterol já foram relatados previamente pelo nosso grupo (TORRES *et al*., 2009c).

6.5 Considerações gerais

Ao verificar as alterações laboratoriais nos quatro grupos, constatou-se que as variáveis importantes neste estudo, como glicemia e triglicerídeos, estavam mais elevadas nos grupos 2 e 3 que no G1. Esses achados podem indicar que as glitazonas atuam diretamente nos vasos coroideanos, assim como atuam diretamente na parede arterial. Portanto, sua ação no globo ocular, assim como na parede arterial, provavelmente independe do controle metabólico (CLAUDEL *et al*., 2001; COLLINS *et al*., 2001; LEVI *et al.,* 2003).

No presente estudo, a avaliação experimental das anormalidades precoces induzidas pela hipercolesterolemia e o possível uso da rosiglitazona para atenuá-

las foram sublinhados pela histomorfometria da esclera e coroide, assim como pela análise imuno-histoquímica da retina. Futuros estudos analisando *ATP-binding cassette transporter A1* e o *scavenger receptor BI* do EPR poderão verificar se essa droga estimula o efluxo de colesterol da coroide e esclera para a circulação coroideana, preservando, assim, a anatomia coriorretiniana. Similarmente, a avaliação do NOS-2 retiniano será importante para mostrar o efeito da glitazona na preservação das células neuronais retinianas em modelo experimental de hipercolesterolemia.

Frisa-se que as alterações retinianas iniciais causadas pela hipercolesterolemia, realçando principalmente o acometimento das camadas internas da retina, não foram tão exploradas cientificamente até a presente data. Este estudo ajuda a entender a fisiopatologia da doença macular degenerativa e aproxima ainda mais a DMRI da gênese da doença aterosclerótica.

6.6 Perspectivas do uso da rosiglitazona para modelo da DMRI

Com a melhoria do atendimento médico em todas as camadas sociais, observa-se aumento da expectativa de vida global. Esse fato, considerado extremamente positivo, acarreta obviamente alta incidência de doenças degenerativas que são inerentes ao processo de envelhecimento. Muitas dessas doenças podem ser evitadas ou ter sua expressão atenuada, enquanto outras não. A degeneração macular relacionada à idade, considerada uma das principais causas de cegueira irreversível da terceira idade, é uma doença multifatorial. Quanto à questão genética, recentes avanços da ciência criam expectativas muito positivas. Por outro lado, fatores nutricionais, ambientais e cardiovasculares, que estão vinculados necessariamente à melhor qualidade de vida, tornam essa doença de difícil controle, principalmente nos países em desenvolvimento. A compreensão de que a hipercolesterolemia pode induzir ou agravar a degeneração macular, além de ser extremamente maléfica ao sistema cardiovascular, é uma necessidade real da sociedade que está envelhecendo. Sendo assim, a prevenção da aterosclerose com atividade física, alimentação saudável e abandono do tabagismo é fundamental também para a preservação

da visão.

Uma vez instalada a doença degenerativa macular, os tratamentos até hoje propostos não proporcionaram, na maioria dos casos, melhora da acuidade visual e muito menos a cura. É importante o entendimento da fisiopatogenia dessa doença, para que novas drogas sejam desenvolvidas e tenham melhor eficácia. Alguns dados, já comprovados, são fundamentais para esse objetivo. Entre eles, destaca-se a hipofunção das células do EPR, que leva ao acúmulo de lipídios e depósitos na membrana de Bruch (EAGLE, 1984; ESPINOSA-HEIDMANN *et al*., 2006; HOGAN, 1972). A partir desse fato, pode desencadear no complexo esclerocoriorretiniano a mesma sequência de eventos observados na aterosclerose. Ou seja, a presença de LDL provoca a liberação de MCP-1 pelas células do EPR e do endotelio vascular, atraindo monócitos. Pode também haver aumento da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais ativadas, recrutando monócitos para a parede vascular. Uma vez instalados na parede vascular, os monócitos recrutados ingerem LDL oxidada, liberando citocinas inflamatórias e a enzima matrix metaloproteinase, MMP-9 (RICOTE *et al*., 1998a). Essa enzima degrada a matrix extracelular e tem potencial para lesar também a membrana de Bruch, provocando, assim, a migração de vasos da coriocapilar para o espaço subretiniano. As citocinas inflamatórias liberadas pelos macrófagos, como TNF-alfa e interleucinas, agravam o quadro, podendo induzir apoptose neuronal e aumento da expressão de MMP-9 (SAREN; WELGUS; KOVANEN, 1996). A FIG. 11 mostra a sequência de eventos que ocorrem na parede vascular arterial, responsável pela formação da placa ateromatosa, assim como a possível participação na fisiopatogenia da DMRI.

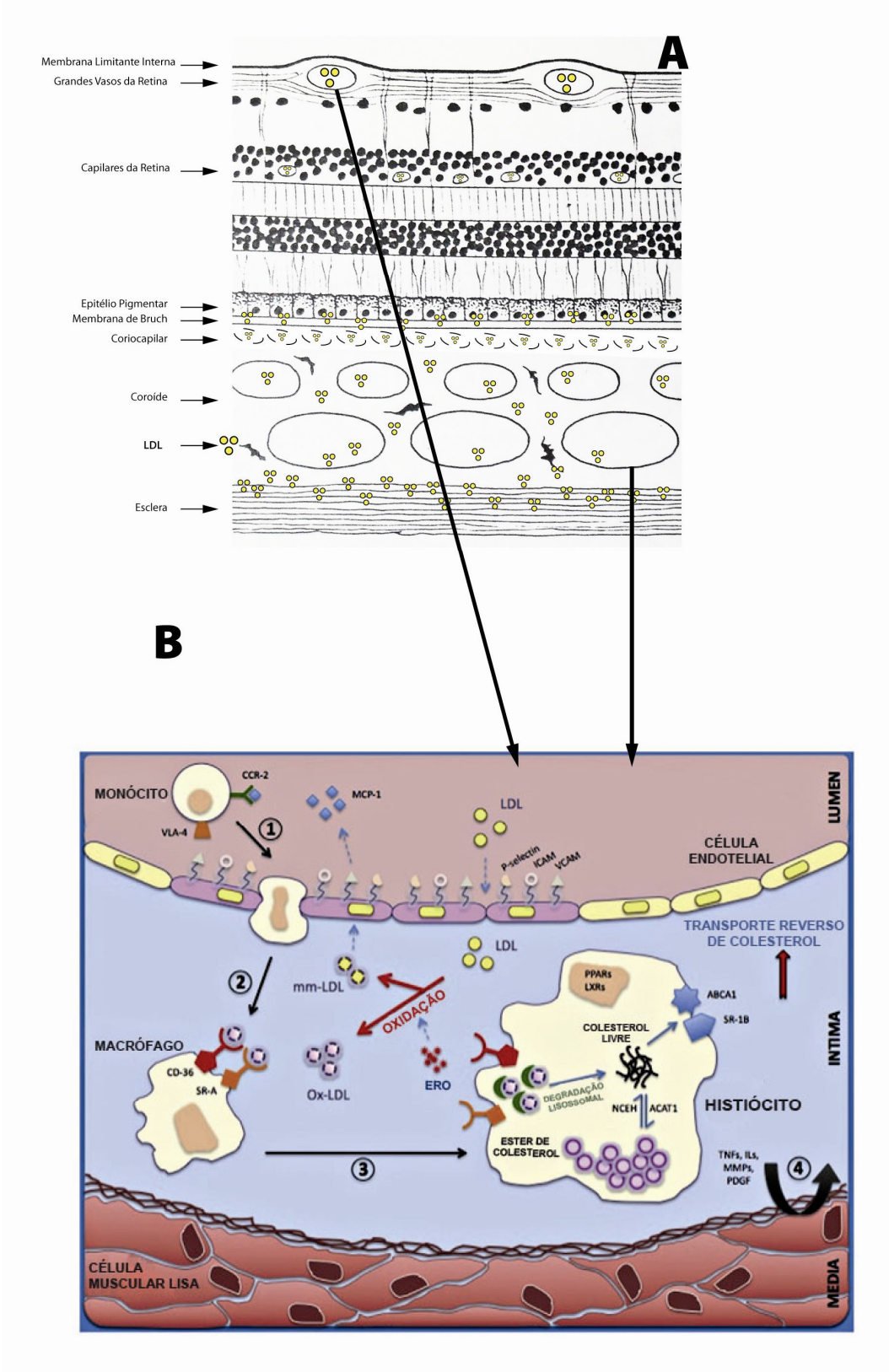


Figura 11 – Desenho esquemático demonstrando a formação da placa aterosclerótica.

A fotografia A demonstra a presença de LDL nas várias estruturas oculares. Destaque para LDL nas artérias retinianas e nos grandes vasos da coroide. A fotografia B demonstra a sequência de eventos originados a partir da disfunção endotelial arterial que pode ser ocasionada pela

dislipidemia, hipertensão arterial, tabagismo, toxinas, fatores hemodinâmicos, reações imunes e viroses, entre outros fatores. A injúria do endotélio vascular provoca a penetração passiva de LDL para íntima vascular e exacerbação de moléculas de adesão vascular (P-Selectin, ICAM e VCAM) que, junto com os ligantes de MCP-1 e seus receptores CCR2, facilitam a ativação de monócitos e adesão ao endotélio (passo 1). A LDL após absorvida pelo endotélio sofre ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e é convertida em mm-LDL (LDL oxidada minimamente modificado) e Ox-LDL (LDL extensivamente oxidada). Ao atravessar o endotélio, os monócitos difereciam-se em macrófagos (passo 2). Esses macrófagos absorvem LDL oxidada através de *scavenger receptors* (CD36 e SR-A), formando os histiócitos (*passo* 3). Os histiócitos expressam citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral, interleucinas e interferon), enzimas (cisteína proteinases, serina proteinases e metaloproteínases) e fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF, fator de crescimento derivado do endotélio – VEGF e fator de crescimento similar à insulina – IGFs) que ao lado de citocinas liberadas pelas células T ativadas promovem processo inflamatório, proliferação e migração de células musculares lisas e células endoteliais para dentro da íntima. Esse esquema demonstra a formação da placa ateromatosa. A ocorrência desses eventos em vasos da retina e coroide poderiam ajudar a desencadear ou agravar a DMRI (SAHA *et al.,* 2009, p. 110).

Inicialmente, é necessário observar que, além dos macrófagos, as células do EPR também expressam CD36 (FINNERMANN; SILVERSTEIN, 2001), apoliproteína E (apoE) (ISHIDA *et al*., 2004), *scanvenger receptor BI* (SR-BI) (DUNCAN *et al*., 2002), ATP ligante cassete subfamília A 1 (ABCA1) (STEWART *et al*., 2003) e apoA1, a principal lipoproteína da HDL (ISHIDA *et al*., 2006), que estão reconhecidamente envolvidos no transporte reverso do colesterol (RADER, 2003). Assim, os casos de DMRI inicial com alterações do EPR e/ou drusas na região macular cuja possibilidade de avanço da doença é significativa, o eventual uso tópico de agonista do PPAR gama, na forma de colírio ou injetado no espaço subtenoniano, pode ter sua indicação. Ao aumentar a expressão de CD36 (TONTONOZ *et al*., 1998), há, teoricamente, mais influxo de lipídios, originados da fagocitose das extremidades dos fotorreceptores para as células do EPR. O aumento da expressão do SR-BI e ABCA1, provocado pelas glitazonas (CHINETTI *et al*., 2000 e 2001), facilita o efluxo da LDL oxidada das células do EPR. A consequente elevação da apoA1, também produzida pela glitazona (CLAUDEL *et al*., 2001), possibilita a passagem de lipídios pela membrana de Bruch para a coriocapilar.

Destaca-se que a idade impõe progressivo espessamento da membrana de Bruch, provocando redução da condutibilidade hidráulica, diminuindo 10 vezes a permeabilidade macromolecular na nona década de vida, ao comparar-se à primeira década (MOORE; HUSSAIN; MARSHALL, 1995). Normalmente, proteínas com peso molecular acima de 200 Kda atravessam a MB, porém, na

terceira idade, a permeabilidade limita-se a proteínas compreendidas entre 100 e 200 Kda. Sabe-se que o peso molecular da apoA1 é de aproximadamente 28 Kda. Desta forma, nascentes das partículas de HDL, tal como HDL pré-beta, podem ser importantes na remoção de lipídios do EPR e MB na terceira idade (ISHIDA *et al*., 2006). Após transpor a membrana de Bruch, os lipídeos entram na coriocapilar e seguem o fluxo normal para o fígado. Então, o uso de agonista do PPAR gama teoricamente teria a possibilidade de estabilizar ou até mesmo provocar a regressão das alterações iniciais da DMRI.

Nos casos de DMRI exsudativa, eventual injeção intravítrea de agonista do PPAR gama pode provocar regressão da neovascularização sub-retiniana, como já demonstrado experimentalmente (MURATA *et al*., 2000). É importante lembrar que essa droga não apresenta somente a propriedade antiVEGF, como informado naquele estudo. Inicialmente, os agonistas do PPAR reduzem a liberação de MCP-1 das células endoteliais vasculares, inibindo a adesão de macrófagos na parede dos vasos (SEKI *et al*., 2005). Após remover cirurgicamente a membrana neovascular sub-retiniana de 10 olhos, verificou-se expressão de MCP ++ para +++ no EPR (GROSSNIKLAUS *et al*., 2002). Os agonistas do PPAR gama poderiam, assim, inibir a expressão do MCP-1 no EPR, reduzindo o recrutamento de monócitos e inibindo a neovascularização subretiniana.

Outro trabalho analisou a evolução da membrana neovascular sub-retiniana induzida pela fotocoagulação, em camundongos normais e em camundongos geneticamente deficientes de moléculas de adesão leucocitária CD-18 e ICAM-1. O tamanho da MNSR nos camundongos deficientes de CD18 e ICAM-1 foi significativamente menor que nos camundongos normais (SAKURAI *et al*., 2003b). Sabe-se que os agonistas do PPAR gama inibem a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais ativadas, reduzindo significativamente a instalação de monócitos e macrófagos na parede arterial, inibindo, assim, a formação de placas ateroscleróticas (PASCERI *et al*., 2000). Desta forma ao impedir o recrutamento de macrófagos no local da lesão, a partir da redução da expressão de ICAM-1 e VCAM-1, pode-se obter também regressão da neovascularização sub-retiniana.

Estudos experimentais realizados em camundongos utilizaram clodronato liposomal, depressor farmacológico seletivo de macrófagos, com o intuito de

avaliar o comportamento da MNSR induzida pela fotocoagulação. Tais pesquisas referenciaram que a depressão generalizada de macrófagos provoca diminuição do tamanho e impregnação da membrana neovascular (ESPINOSA-HEIDMANN *et al*., 2003; SAKURAI *et al*., 2003a). Como citado anteriormente, os agonistas do PPAR gama, além de impedir o recrutamento de macrófagos, têm o potencial de provocar apoptose dessas células (CHINETTI *et al*., 1998), o que possibilitaria a regressão da neovascularização sub-retiniana.

Uma vez instalados, os macrófagos ou histiócitos produzem citocinas ou mediadores inflamatórios como TNF-alfa e interleucinas, que promovem, pelos menos em parte, a angiogênese na MNSR ao estimular a produção de VEGF pelas células do EPR (OH *et al*., 1999). Já se confirmou que os agonistas do PPAR gama inibem a liberação desses mediadores inflamatórios (CHINETTI *et al*., 1998; RICOTE *et al*., 1998a), podendo contribuir para a regressão dos neovasos coroideanos.

Outra investigação visou a avaliar a presença de matriz metaloproteinase nas MNSR removidas cirurgicamente de cinco olhos humanos. Registrou-se a presença de MMP-2 nas formações neovasculares e MMP-9 na membrana de Bruch, demonstrando-se que a matrix metaloproteínas está envolvida no progressivo crescimento da MNSR (STEEN *et al*., 1998). É importante lembrar que a ativação do PPAR gama reduz a liberação de matrix metaloproteinase (MARX *et al.,* 1998b), podendo, assim, inibir a formação de neovasos sub-retinianos.

Outro relato enfatizou prevenção na formação de MNSR, induzida pela fotocoagulação, em camundongos deficientes geneticamente da expressão de PAI-1. Ao evidenciar a atividade pró-angiogência de PAI-1 na formação da MNSR, os autores identificaram o inibidor 1 de ativador de plasminogênio como eventual alvo terapêutico no combate à DMRI úmida (LAMBERT *et al*., 2001). A exposição às tiazolidinedionas inibiu a expressão do PAI-1 em células endoteliais humanas e em pré-adipócitos (ZIRLIK *et al*., 2004), por isso, esse tipo de droga teria condição de promover a regressão da neovascularização sub-retiniana por essa abordagem.

Outro estudo investigou os efeitos do *N-monomethyl-l-arginine (*L-NMMA*),* um inibidor do NOS não especifico, em 3 modelos de neovasularização ocular. A

adminstração de L-NMMA causou significativa inibição da neovascularização de coroide em olhos de ratos submetidos à ruptura da MB com fotocoagulação. Esses dados significam que o NO sintetizado pelo NOS-2 (induzível) é um importante estimulador da neovascularização de coroide e que a redução de NO por meios genéticos ou farmacológicos é uma boa estratégia de tratamento da MNSR. Sabe-se que a deficiência de eNOS suprime a neovascularização retiniana, mas não a coroideana, enquanto que a deficiência de nNOS (neuronal) ou o NOS-2 (induzível) suprime a neovascularização coroideana, mas não a retiniana (ANDO *et al*., 2002). A ativação do PPAR-gama promove aumento da expressão de eNOS. O NO liberado preserva o endotélio vascular e previne a aterosclerose (BERGER *et al*., 2003; SUN *et al*., 2000). Os agonistas do PPAR gama também reduzem a expressão de iNOS (LIU *et al*., 2004; RICOTE *et al*., 1998b). Neste caso, a redução do NO teria efeito benéfico por suprimir a neovascullariuzação coroideana, diminuindo a possibilidade de apoptose celular e peroxidação lipídica retiniana (HU; van ELDIK, 1996; TAO *et al*., 2003; YÜCEL *et al*., 2005). Logo, essa classe de medicamento poderia teoricamente ser utilizada no tratamento da DMRI exsudativa, por reduzir a expressão do iNOS.

Evidentemente, existe um longo caminho a ser percorrido para a utilização dessa droga em olhos humanos. Inicialmente, nos casos de uso tópico, há necessidade de se observar a penetrabilidade da droga nos meios oculares, bem como a toxicidade. O estudo experimental que utilizou essa modalidade de droga para avaliar regressão de neovasos subretinianos salientou não haver toxicidade ao ser injetada intravítrea (MURATA *et al*., 2000). Quanto ao uso sistêmico, existem no momento vários questionamentos. Sabe-se que a rosiglitazona foi líder de vendas nos Estados Unidos, correspondendo a 20% das prescrições de medicamentos para o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2. Após a metanálise realizada por Nissen e Wolski em maio de 2007, que encontrou 43% mais de risco de infarto do miocárdio em relação a outras medicações para tratamento de diabetes *mellitus* (NISSEN; WOLSKI, 2007), houve insegurança quanto ao uso dessa droga.

Se sistemicamente o uso dessa substância pode ser questionado por aumentar a mortalidade, a adminstração tópica, na forma de colírio ou injetado na câmara vítrea, deve ser refletida de forma aprofundada, visto que a absorção e

consequente concentração sistêmica seria muito menor.

Finalmente, os agonistas do PPAR gama, a partir de seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiangiogênios, desempenham importante papel no tratamento da doença aterosclerótica. Devido à similaridade fisiopatogênica entre a doença aterosclerótica e a DMRI, essas drogas podem ser nova opção no tratamento da DMRI seca ou exsudativa.

7 CONCLUSÕES

- A dieta hipercolesterolêmica administrada diariamente foi capaz de provocar anormalidades precoces na esclera, coroide e retina de coelhos. No complexo esclerocoroideano foi observado aumento significativo espessura devido à abundância de histiócitos e fibras colágenas. Na retina, observou-se significativo aumento da imunoretavidade ao anticorpo anti-calretinina.
- A rosiglitazona, um agonista do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo, demonstrou ser efetiva na atenuação dessas anormalidades.

REFERÊNCIAS

Utilizadas:

AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. **Ophthalmology**, v. 107, p. 2224-32, 2000.

ALESSI, A. *et al.* Use of rosiglitazone before and after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: Assessment of neointimal formation. **Thromb J,** v. 6, p. 12, 2008.

ALJADA, A. *et al.* Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor-kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 3250-6, 2001.

AMBATI, J. *et al.* Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. **Surv Ophthalmol**, v. 48, p. 257-93, 2003.

ANDO, A. *et al.* Blockade of nitric-oxide synthase reduces choroidal neovascularization. **Mol Pharmacol,** v. 62, n. 3, p. 539-44, 2002.

ASSMANN, G.; NOFER, J.R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. **Annu Rev Med**, v. 54, p. 321-41, 2003.

BAILEY, T.A, *et al.* Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, p. 675-84, 2004.

BARBIER, O. *et al.* Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 22, p. 717-26, 2002.

BERGER, J.P.; MOLLER, D.E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 409-35, 2002.

BERGER, J.P. *et al.* Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. **Mol Endocrinol**, v. 17, p. 662-76, 2003.

BILLING-MARCZAK, K.; KUZNICKI, J. Calretinin--sensor or buffer--function still unclear. **Pol J Pharmacol**, v. 51, p. 173-8, 1999.

BÖKER, T.; FANG, T.; STEINMETZ, R. Refractive error and choroidal perfusion characteristics in patients with choroidal neovascularization and age-related macular degeneration. **Germ J Ophthalmol,** v. 2, p. 10-3, 1993.

BROEKHUYSE, R.M. The lipid composition of aging sclera and cornea. **Ophthalmologica,** v. 171, p. 82-5, 1975.

CHAWLA, A. *et al.* Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**, v. 294, p. 1866-70, 2001a.

CHAWLA, A. *et al.* PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 48-52, 2001b.

CHAWLA, A. *et al.* PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. **Mol Cell**, v. 7, p. 161-71, 2001c.

CHEN, J.C. *et al.* Functional loss in age-related Bruch's membrane change with choroidal perfusion defect. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** v. 33, p. 334-40, 1992.

CHINETTI, G. *et al.* Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. **J Biol Chem,** v. 273, n. 40, p. 25573-80, 1998.

CHINETTI, G. *et al.* CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. **Circulation,** v. 101, n. 20, p. 2411-7, 2000.

CHINETTI, G. *et al.* PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 53-8, 2001.

CHIQUETTE, E.; RAMIREZ, G.; DEFRONZO, R. A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors. **Arch Intern Med**, v. 164, n. 19, p. 2097-104, 2004.

CHIU, C.J. *et al.* Dietary glycemic index and carbohydrate in relation to early age-related macular degeneration. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 4, p. 880-6, 2006.

CHO, E. *et al.* Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2, p. 209-18, 2001.

CHUA, B. *et al.* Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy. **Arch Ophthalmol**, v. 124, n. 7, p. 981-6, 2006.

CIULLA, T.A.; DANIS, R.P.; HARRIS, A. Age-related macular degeneration: a review of experimental treatments. **Surv Ophthalmol**, v. 43, p. 134-46, 1998.

CLAUDEL, T. *et al.* Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 5, p. 2610-5, 2001.

COGAN, D.G.; KUWABARA, T. Ocular changes in the experimental hypercholesterolemia. **Arch Ophthalmol**, v. 61, p. 219-25, 1959.

COLLINS, A.R. *et al.* Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Artheroscl Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 365-71, 2001.

COUSINS, S.W.; ESPINOSA-HEIDMANN, D.G.; CSAKY, K.G. Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration. **Arch Ophthalmol**, v. 122, p. 1013-8, 2004.

DASHTI, N. *et al.* Plasma apolipoproteins and risk for age related maculopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 90, p. 1028-33, 2006.

DECHESNE, C.J. *et al.* Identification and ultrastructural localization of a calretinin-like calcium-binding protein (protein 10) in the guinea pig and rat inner ear. **Brain Res**, v. 560, p. 139-48, 1991.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr Rev**, v. 20, n. 5, p. 649-88, 1999.

DUNCAN, K.G. *et al.* Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 292, p. 1017-22, 2002.

EAGLE, R.C. Mechanisms of maculopathy. **Ophthalmology,** v. 91, n. 6, p. 613-25, 1984.

ESPARZA-GORDILLO, J. *et al.* Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. **Immunogenetics,** v. 56, p. 77-82, 2004.

ESPINOSA-HEIDMANN, D.G. *et al.* Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, p. 729-37, 2006.

ESPINOSA-HEIDMANN, D.G. *et al.* Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, p. 3586-92, 2003.

EVANS, J.R. Risk factors for age-related macular degeneration. **Prog Retin Eye Res**, v. 20, n. 2, p. 227-53, 2001.

FINNEMANN, S.C.; SILVERSTEIN, R.L. Differential roles of CD36 and alphavbeta5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. **J Exp Med**, v. 194, n. 9, p. 1289-98, 2001.

FISHER, R.F. The influence of age on some ocular basement membranes. **Eye,** v. 1, p. 184-9, 1987.

FONSECA, V. *et al.* Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 283, p. 1695-702, 2000.

FRANÇA NETO, O.R. *et al*. Effects of rosiglitazone on contralateral iliac artery after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits. **Thromb J**, v. 6, p. 4, 2008.

FRIEDMAN, D.S. *et al.* Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. **Arch Ophthalmol**, v. 122, p. 564-72, 2004.

FRIEDMAN, E. A hemodynamic model of the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Am J Ophthalmol**, v. 124, p. 677-82, 1997.

FRIEDMAN, E. *et al.* Ocular blood flow velocity in age-related macular degeneration. **Ophthalmology,** v. 102, p. 640-6, 1995.

FRIEDMAN, E. *Et al.* Increased scleral rigidity and age-related macular degeneration. **Ophthalmology,** v. 96, p. 104-8, 1989.

FRIEDMAN, E. The role of the atherosclerotic process in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **Am J Ophthalmol***,* v. 130, p. 658-63, 2000.

GOLDBERG, R.B. *et al.* GLAI Study Investigators. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1547-54, 2005.

GROSSNIKLAUS, H.E. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. **Mol Vis**, v. 8, p. 119-26, 2002.

GRUNWALD, J.E. *et al.* Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 39, p. 385-90, 1998.

HAGEMAN, G.S. *et al.* An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. **Prog Retin Eye Res**, v. 20, p. 705-32, 2001.

HAN, K.H. *et al.*Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **J Clin Invest**, v. 106, p. 793-802, 2000.

HODIS, H.N. *et al.* Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment on subclinical atherosclerosis in patients with insulin-requiring type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1545-53, 2006.

HOGAN, M.J.; ALVARADO, J.A.; WEDDELL, H.E. **Histology of the human eye.** Philadelphia, WB Saunders, 1971.

HOGAN, M.J. Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. **Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol,** v. 76, n. 1, p. 64-80, 1972.

HOLZ, F.G. *et al.* Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. **Arch Ophthalmol,** v. 112, p. 402-6, 1994.

HOME, P.D. *et al.* RECORD Study Team. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. **Lancet,** v. 373, n. 9681, p. 2125-35, 2009.

HSUEH, W.A.; Bruemmer, D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. **Hypertension,** v. 43, p. 297-305, 2004.

HU, J.; VAN ELDIK, L.J. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured Astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1313, p. 239-45, 1996.

HYMAN, L. *et al.* Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. **Arch Ophthalmol**, v. 118, n. 3, p. 351-8, 2000.

ISHIDA, B.Y. *et al.* High density lipoprotein mediated lipid efflux from retinal pigment epithelial cells in culture. **Br J Ophthalmol***,* v. 90, p. 616-20, 2006.

ISHIDA, B.Y. *et al.* Regulated expression of apolipoprotein E by human retinal pigment epithelial cells. **J Lipid Res**, v. 45, p. 263-71, 2004.

JACKSON, S.M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. **Atheroscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, p. 2094-104, 1999.

JANDE, S.S.; MALER, L.; LAWSON, D.E. Immunohistochemical mapping of vitamin D-dependent calcium-binding protein in brain. **Nature,** v. 294, p. 765-7, 1981.

JANES, R.G. Changes in the rabbit`s eye caused by cholesterol feeding. **Am J Ophthalmol**, v. 58, p. 819-28, 1964.

JOHNSON, G.J.; GRIGGS, T.R.; BADIMON, L. The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb Haemost,** p. 81835-43, 1999.

JOHNSON, N.F.; GRIERSON, I. Post-mortem changes in the rabbit retina. A study by light microscopy. **Acta Ophthalmol** (Copenh), v. 54, n. 5, p. 529-41, 1976.

KANTOR, B. *et al.* The experimental animal models for assessing treatment of restenosis. **Cardiovasc Radiation Med,** v. 1, p. 48-54, 1999.

KELLY, I.E. *et al.* Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, p. 288-93, 1999.

KHAN, J.C. *et al.* Genetic factors in AMD Study. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. **Br J Ophthalmol**, v. 90, p. 75-80, 2006.

KILLINGSWORTH, M.C.; SARKS, J.P.; SARKS, S.H. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. **Eye,** v. 4, p. 613-21, 1990.

KLEIN, R. *et al.* The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 36, p. 182-91, 1995.

KLIFFEN, M. *et al.* Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 81, n. 2, p. 154-62, 1997.

KUREBAYASHI, S. *et al.* A novel thiazolidinedione MCC-555 down-regulates tumor necrosis factor-alpha-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 182, p. 71-7, 2005.

KVANTA, A. *et al.* Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 37, n. 9, p. 1929-34, 1996.

KWAK, B.R. *et al.* PPARgamma but not PPARalpha ligands are potent repressors of major histocompatibility complex class II induction in atheroma-associated cells. **Circ Res**, v. 90, p. 356-62, 2002.

LAMBERT, V. *et al.* Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. **FASEB J**, v. 15, p. 1021-7, 2001.

LAW, R.E. *et al.* Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. **Circulation,** v**.** 101, p. 1311-8, 2000.

LEE, P.; WANG, C.C.; ADAMIS, A.P. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. **Surv Ophthalmol**, v. 43, p. 245-69, 1998.

LEVI, Z. *et al.* Rosiglitazone (PPARgamma-agonist) attenuates atherogenesis with no effect on hyperglycaemia in a combined diabetes-atherosclerosis mouse model. **Diabetes Obes Metabol,** v. 5, p. 45-50, 2003.

LIU, H.R. *et al.* Anti-apoptotic effects of rosiglitazone in hypercholesterolemic rabbits subjected to myocardial ischemia and reperfusion. **Cardiovasc Res**, v. 62, p. 135-44, 2004.

LOPEZ, P.F. *et al.* Transdifferentiated RPE cells and VEGF immunoreactivity in surgically-excised ARMD-related choroidal neovascular membranes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 37, p. 855-68, 1996.

MARX, N. PPAR gamma and vascular inflammation: adding another piece to the puzzle. **Circ Res**, v. 91, p. 373-4, 2002.

MARX, N. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 83, n. 11, p. 1097-103, 1998a.

MARX, N. *et al.* Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. **Am J Pathol**, v. 153, p. 17-23, 1998b.

McCARTY, C.A., *et al.* Cholesterol-lowering medications reduce the risk of age-related maculopathy progression. **Med J Aust**, v. 175, p. 340, 2001.

McGWIN, G.; XIE, A.; OWSLEY, C. The use of cholesterol-lowering medications and age-related macular degeneration. **Ophthalmology,** v. 112, p. 488-94, 2005.

METELITSINA, T.I. *et al.* Effect of systemic hypertension on foveolar choroidal blood flow in age related macular degeneration. **Br J Ophthalmol**, v. 90, n. 3, p. 342-6, 2006.

MICELI, M.V. *et al.* Pathologic changes in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane of fat-fed atherogenic mice. **Curr Eye Res**, v. 20, p. 8-16, 2000.

MINAMIKAWA, J. *et al.* Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, p. 1818-20, 1998**.**

MÖCKEL, V.; FISCHER, G. Vulnerability to excitotoxic stimuli of cultured rat hippocampal neurons containing the calcium-binding proteins calretinin and calbindin D28K. **Brain Res,** v. 648, p. 109-20, 1994.

MOORE, D.J.; HUSSAIN, A.A.; MARSHALL, J. Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 36, p. 1290-7, 1995.

MURATA, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** v. 41, p. 2309-17, 2000.

MURTHY, S.N. *et al.* Rosiglitazone reduces serum homocysteine levels, smooth muscle proliferation, and intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats fed a high methionine diet. **Metabolism,** v. 54, n. 5, p. 645-52, 2005**.**

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **Engl J Med**, v. 356, p. 2457-71, 2007.

OH, H. *et al.* The potencial angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, p. 40, p. 1891-8, 1999.

ONG, J.M. *et al.*Effects of cholesterol and apolipoprotein E on retinal abnormalities in ApoE-deficient mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, p. 1891-1900, 2001.

PAKALA, R. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Its role in atherosclerosis and restenosis. **Cardiovasc Radiat Med**, v. 5, p. 44-8, 2004.

PASCERI, V. *et al.* Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. **Circulation,** v. 101, p. 235-8, 2000.

PATEL, C.B. *et al.* Thiazolidinediones and risk for atherosclerosis: pleiotropic effects of PPar gamma agonism. **Diab Vasc Dis Res**, v. 3, p. 65-71, 2006.

PAULEIKHOFF, D. *et al.* Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. **Ophthalmology,** v. 97, n. 2, p. 171-8, 1970.

PAULEIKHOFF, D. *et al.* Choroidal perfusion abnormality with age-related Bruch's membrane change. **Am J Ophthalmol,** v. 109, p. 211-7, 1990.

PENFOLD, P.L.; KILLINGSWORTH, M.C.; SARKS, S.H. Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 223, p. 69-76, 1985.

PERSHADSINGH, H.A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: therapeutic target for diseases beyond diabetes: quo vadis? **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, p. 215-28, 2004.

PICARD, F.; AUWERX, J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. **Annu Rev Nutr**, v. 22, p. 167-97, 2002.

POST, M.J.; BORST, C.; KUNTZ, R.E. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. **Circulation,** v. 89, p. 2816-21, 1994.

PUSKÁS, L.G. *et al.* Cholesterol and cholesterol plus DHA diet-induced gene expression and fatty acid changes in mouse eye and brain. **Biochimie,** v. 86, p. 817-24, 2004.

QUEIROZ, J.M.; VIANA, J.C.; SILVA, F.G. Lesões oculares na hipercolesterolemia experimental do coelho em relação à patogênese da retinite de Coats. **Rev Assoc Med Brasil**, v. 4, p. 328-38, 1958.

RADER, D.J. Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. **Am J Cardiol,** v. 92, n. 4A, p. 42J-49J, 2003.

RAMÍREZ, A.I. *et al.*Macroglial and retinal changes in hypercholesterolemic rabbits after normalization of cholesterol levels. **Exp Eye Res**, v. 83, p. 1423-38, 2006.

RAMÍREZ, J.M. *et al.* Structural specializations of human retinal glial cells. **Vision Res,** v. 36, p. 2029-2036, 1996.

RAMRATTAN, R.S. *et al.* Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 35, p. 2857-64, 1994.

RICOTE, M. *et al.* Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 7614-9, 1998a.

RICOTE, M. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature,** v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998b.

RÍOS-VÁZQUEZ, R. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists for management and prevention of vascular disease in patients with and without diabetes mellitus. **Am J Cardiovasc Drugs**, v. 6, n. 4, p. 231-42, 2006.

RISÉ, P. *et al*. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids is inhibited in vivo in hypercholesterolemic rabbits and in vitro by oxysterols. **Prostag Leukot Essent Fatty Acids,** v. 71, p. 79-86, 2004.

ROBERTS, A.W. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in atherosclerosis: current evidence and future directions. **Curr Opin Lipidol**, v. 14, p. 567-73, 2003.

RUDOLF, M. *et al.* Increased expression of vascular endothelial growth factor associated with accumulation of lipids in Bruch's membrane of LDL receptor knockout mice. **Br J Ophthalmol**, v. 89, p. 1627-30, 2005.

SAHA, P. *et al.* The monocyte/macrophage as a therapeutic target in aterosclerosis. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, p. 109-118, 2009.

SAKURAI, E. *et al.* Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, p. 3578-85, 2003a.

SAKURAI, E. *et al.* Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, p. 2743-9, 2003b.

SALAZAR, J.J. *et al.*Alterations in the choroid in hypercholesterolemic rabbits: reversibility after normalization of cholesterol levels. **Exp Eye Res**, v. 84, p. 412-22, 2007.

SÁNCHEZ-HIDALGO, M. *et al.* Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. **Biochem Pharmacol**, v. 69, p. 1733-44, 2005.

SanGIOVANNI, J.P. *et al.* Age-Related Eye Disease Study Research Group. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report n°. 20. **Arch Ophthalmol**, v. 125, n. 5, p. 671-9, 2007.

SARÉN, P.; WELGUS, H.G.; KOVANEN, P.T. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. **J Immunol,** v. 157, p. 4159-65, 1996.

SARKS, J.P.; SARKS, S.H.; KILLINGSWORTH, M.C. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. **Eye,** v. 2, p. 552-77, 1988.

SASTRY, B.V.; HEMONTOLOR, M.E. Influence of nicotine and cotinine on retinal phospholipase A2 and its significance to macular function. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 14, p. 447-58, 1998.

SEDDON, J.M. *et al.* Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. **Arch Ophthalmol**, v. 119, n. 8, p. 1191-9, 2001.

SEDDON, J.M. *et al.* Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. **Arch Ophthalmol**, v. 121, p. 785-92, 2003.

SEKI, N. *et al.* A potent activator of PPARalpha and gamma reduces the vascular cell recruitment and inhibits the intimal thickning in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis,** v. 178, p. 1-7, 2005.

SHEN, W.Y. *et al.* Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. **Br J Ophthalmol**, v. 82, n. 9, p. 1063-71, 1998.

SHERAIDAH, G. *et al.* Correlation between lipids extracted from Bruch's membrane and age. **Ophthalmology,** v. 100, n. 1, p. 47-51, 1992.

SMEETH, L., *et al.* A case control study of age related macular degeneration and use of statins. **Br J Ophthalmol**, v. 89, p. 1171-5, 2005.

SMITH, W. *et al*. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. **Ophthalmology,** v. 108, p. 697-704, 2001.

SOROCÉANU, M.A. *et al.* Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. **J Endocrinol**, v. 183, p. 203-216, 2004.

STARITA, C. *et al.* Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease. **Exp Eye Res,** v. 62, p. 565-72, 1996.

STEEN, B. *et al.* Matrix metalloproteinases and metalloproteinases inhibitors in choroidal neovascular membranes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 39, p. 2194-200, 1998.

STEWART, J.M. *et al.* Expression of reverse cholesterol transport proteins SR-BI, SR-BII e ABCA1 in the human retinal pigment epithelium. Abstract 1711 in Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). **Ann Meet**, May 4-9, Fort Lauderdale, Fl, 2003.

STRYKER, W.S. *et al.* The relation of diet, cigarette smoking, and alcohol consumption to plasma beta-carotene and alpha-tocopherol levels. **Am J Epidemiol,** v. 127, p. 283-96, 1988.

SUCHER, N.J.; LIPTON, S.A.; DREYER, E.B. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. **Vision Res**, v. 37, p. 3483-93, 1997.

SUN, Y.P. *et al.* Effects of cholesterol diets on vascular function and atherogenesis in rabbits. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 224, n. 3, p. 166-71, 2000.

SUÑER, I.J. *et al.* Nicotine increases size and severity of experimental choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, p. 311-7, 2004.

TAN, J.S. *et al.* Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. **Ophthalmology,** v. 114, p. 1143-50, 2007.

TAN, N.S. *et al.* Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. **Genes Dev**, v. 15, n. 24, p. 3263-77, 2001.

TAO, L. *et al.* Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterolemia. **Circulation,** v. 108, p. 2805-11, 2003.

TONTONOZ, P. *et al.* PPARgamma promotes monocyte de macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell,** v**.** 93, p. 241-53, 1998.

TORRES, R.J. *et al.* Evaluation of choroid and sclera early alterations in hypercholesterolemic rabbits: histologic and histomorphometric study. **Arq Bras Oftalmol**, v. 72, n. 1, p. 68-74, 2009a.

TORRES, R.J.A. *et al.* Evaluation of early chorioretinal abnormalities in hypercholesterolemic rabbits submitted to the peroxisome proliferator-activated

(PPAR) Gamma agonist treatment (Rosiglitazone): Histological and histomorphometric study. **Vision Pan-America,** v. 8, p. 152-4, 2009b.

TORRES, R.J.A. *et al.* Evaluation of early abnormalities of the sensory retina in hypercholesterolemia experimental model: an immunohistochemical study. **Arq Bras Oftalmol**, v. 72, n. 6, p. 793-98, 2009c.

TRIVIÑO, A. *et al.*A cholesterol-enriched diet induces ultrastructural changes in retinal and macroglial rabbit cells. **Exp Eye Res**, v. 83, p. 357-366, 2006.

van Der SCHAFT, T.L. *et al.* Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study. **Br J Ophthalmol**, v. 77, p. 657-61, 1993.

van LEEUWEN, R. *et al.* Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, p. 3771-7, 2003.

van LEEUWEN, R. *et al.* Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration. **JAMA,** v. 294, n. 24, p. 3101-7, 2005.

VINGERLING, J.R. *et al.* Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. **Arch Ophthalmol**, v. 114, p. 1193-6, 1996.

VINGERLING, J.R. *et al.* Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study. **Am J Epidemiol**, v. 142, p. 404-9, 1995.

VOGT, W.D.M.; WERUAGA-PRIETO, E.; CELIO, M.R. Calretinin-immunoreactivity in organotypic cultures of the rat cerebral cortex: effects of serum deprivation. **Exp Brain Res**, v. 108, p. 101-12, 1996.

VÖLGYI, B. *et al.* Calretinin in neurochemically well-defined cell populations of rabbit retina. **Brain Res**, v. 763, p. 79-86, 1997.

VREUGDENHIL, M. *et al.* Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. **Proc Natl Acad Sci** USA, v. 93, p. 12559-63, 1996.

WELLS, J.A. *et al.* Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. **Br J Ophthalmol**, v. 80, n. 4, p. 363-6, 1996.

WILENSKY, R.L. *et al.* Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit. **Circulation,** v. 92, n. 10, p. 2995-3005, 1995.

WILSON, T.M.; LAMBERT, M.H.; KLIEWER, S.A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 341-67, 2001.

YKI-JÄRVINEN, H. Thiazolidinediones. **N Engl J Med**, v. 351, p. 1106-18, 2004.

YÜCEL, I. *et al.* Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. **Vision Res**,v. 45, p. 1107-14, 2005.

YUEN, V.G. *et al.* Chronic glucose-lowering effects of rosiglitazone and bis(ethylmaltolato)oxovanadium(IV) in ZDF rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 81, p. 1049-55, 2003.

ZHANG, L.; CHAWLA, A. Role of PPARgamma in macrophage biology and atherosclerosis. **Trends Endocrinol Metabol**, v. 15, p. 500-5, 2004.

ZIRLIK, A. *et al.*Direct attenuation of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in human adipose tissue by thiazolidinediones. **Thromb Haemost**, v. 91, p. 674-82, 2004.

Consultadas

Associação Brasileira de normas técnicas. **Comissão de Estudos de Documentação Normas Brasileiras em Documentação**. ed. Atual. Rio de Janeiro: ABNT; 1989.

HERANI, M.C.G. **Normas para apresentações de dissertações e teses**. São Paulo: Bireme; 1990. 45 p.

ROTHER, E.T.; BRAGA, M.E.R. **Como elaborar sua tese:** estrutura e referências. São Paulo: 2001. 86 p.

APÊNDICE E ANEXOS

Apêndice A – Artigos

Carta de aceite do artigo "SCLEROCHORIORETINAL ABNORMALITIES IN HYPERCHOLESTEROLEMIC RABBITS TREATED WITH ROSIGLITAZONE: A HISTOMORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY" pela revista "Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging"

	Rogil J. Torres, M.D., Doctoral Student Universidade Federal de Sao Paulo Rua Emiliano Perneta, 390 Sala 1407 Curitiba, Parana 80.420-080 Brazil RE: OSLI-2009-128 Version 4 Title: SCLEROCHORIORETINAL ABNORMALITIES IN HYPERCHOLESTEROLEMIC RABBITS TREATED WITH ROSIGLITAZONE: A HISTOMORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY Dear Dr Torres: I am pleased that we will be able to publish your manuscript, referenced above, in Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging. You will receive page proofs before publication. Please ensure that these will be reviewed and responded to promptly. Although we try to avoid changes thereafter, we reserve the right to edit for style, clarity, and length prior to final publication. Complimentary copies of the journal, along with a form to order reprints, will be sent to you following publication. Thank you for the opportunity to publish your work. Sincerely yours, Carmen A. Puliafito, M.D. Editor-in-Chief

Conselho Brasileiro de Oftalmologia

Confere aos Doutores

Rogil José de Almeida Torres, Cristina Muccioli, Maurício Maia, Lucia Noronha, Andréa Luchini, Alexandre Alessi, Marcia Olandoski, Renan Pedro de Almeida Torres, Regiane do Rocio de Almeida Torres e Dalton Bertolim Précoma

o Prêmio

Região Sul

pelo trabalho

"Sclerochorioretinal Abnormalities in Hypercholesterolemic Rabbits Submitted to Rosiglitazone Treatment"

apresentado como Tema Livre no XXXV Congresso Brasileiro de Oftalmologia.

Belo Horizonte, agosto de 2009

Dr. Hamilton Moreira
Presidente
Conselho Brasileiro de Oftalmologia

Dr. Eliuberto Ribeiro Gonçalves
Presidente
XXXV Congresso Brasileiro de Oftalmologia

Dr. João Agostini Netto
Presidente
XXXV Congresso Brasileiro de Oftalmologia

Dr. Nilo Holzchuh
Secretário Geral
Conselho Brasileiro de Oftalmologia

Anexo A – Parecer ético

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 20 de julho de 2007.
CEP 0806/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ROGIL JOSÉ DE ALMEIDA TORRES
Co-Investigadores: Cristina Muccioli (orientadora), Maurício maia, Dalton Précoma
Disciplina/Departamento: Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Avaliação das alterações precoses coriorretinianas ocorridas em coelhos hipercolesterolêmicos tratados com agonista de ppar gama rosiglitazona estudo comparativo e controlado histológico histomorfométrico e imunohistoquimico".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria B.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.
OBJETIVOS: Demonstrar através de exames histológicos, histomorfométricos e imuno-histoquímicos que alterações degenerativas na membrana de Bruch, EPR e retina sensorial, em olhos de coelhos, após administração diária de alta dosagem de colesterol. Demonstrar através de exames histológicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos, em olhos de coelhos, que a estimulação de receptores gama do peroxissomo ativado ocular, promovida pela administração sistêmica de rosiglitazona, é capaz de inibir as alterações degenerativas da membrana de Bruch, EPR e retina sensorial ocasionadas pela hipercolesterolemia..
RESUMO: Estudo com 34 coelhos New Zealand. Anestésico: xilazina. Analgésico: flunixin. Eutanásia: dose letal de barbitúrico. O experimento será realizado na cidade de Curitiba, no Hospital Angelina Caron, com coelhos new Zealand. Serão constituídos 3 grupos: grupo controle- 3 coelhos com dieta normal por 6 semanas ; grupo G1 (n=14) receberá dieta com colesterol a 1% por 2 semanas e posteriormente com ração colesterol a 0,5% por 4 semanas; grupo G2 (n=14) receberá ração com colesterol a 1% por 2 semanas e a seguir a 0,5% por 4 semanas, e receberá rosiglitazona 3mg/kg/dia. Somente um olho será escolhido para o estudo histologico e morfométrico. Será realizado estudo imuno-histoquímico com anticorpo GFAP e calretinina..
FUNDAMENTOS E RACIONAL: A Degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) é uma doença degenerativa que afeta a região central da retina, apresentando mecanismo patogenético comum com a doença cardiovascular. Este estudo visa avaliar as alterações degenerativas em olhos de coelhos após administração de colesterol..
MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados, e os cuidados na condução do estudo e apresenta aprovação do CEP local.
DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fundação Araucária - R$ 12 250,00.
CRONOGRAMA: 5 meses.
OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **19/7/2008** e **19/7/2009**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

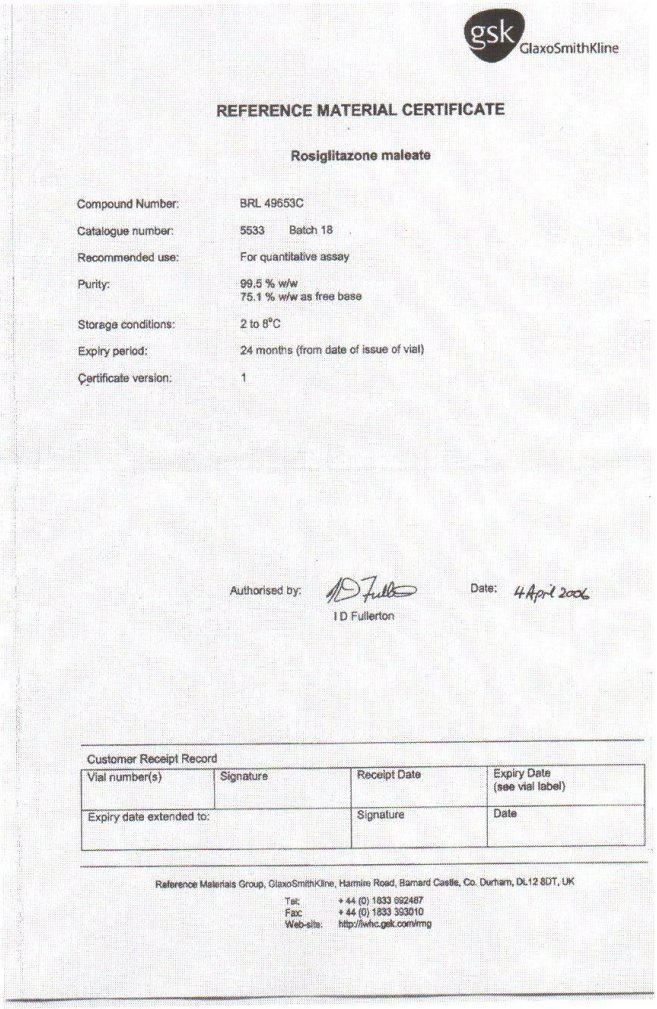
1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

Anexo B - Documento referente ao recebimento da rosiglitazona



GlaxoSmithKline

REFERENCE MATERIAL CERTIFICATE

Rosiglitazone maleate

Compound Number:	BRL 49653C
Catalogue number:	5533 Batch 18
Recommended use:	For quantitative assay
Purity:	99.5 % w/w 75.1 % w/w as free base
Storage conditions:	2 to 8°C
Expiry period:	24 months (from date of issue of vial)
Certificate version:	1

Authorised by: I D Fullerton Date: 4 April 2006

Customer Receipt Record

Vial number(s)	Signature	Receipt Date	Expiry Date (see vial label)
Expiry date extended to:		Signature	Date

Reference Materials Group, GlaxoSmithKline, Harmire Road, Barnard Castle, Co. Durham, DL12 8DT, UK

Tel: + 44 (0) 1833 692467
Fax: + 44 (0) 1833 393010
Web-site: http://iwhc.gsk.com/rmg

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo