



Filipe André Brogueira Rodrigues

Modelo animal para o estudo da fisiopatologia da hipertensão ocular - glaucoma

2009/2010



Relatório Final

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa,

Lisboa, Julho de 2010

página em branco



Trabalho realizado por Filipe André Brogueira Rodrigues, sob a tutoria do Professor Doutor Carlos Neves, no Instituto de Fisiologia/Unidade de Sistema Nervoso Autónomo do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, no âmbito do de uma Bolsa UL/FAD e uma Bolsa GAPIC.

Professor Doutor Carlos Neves
(o tutor)

Filipe Rodrigues
(o tutorando)

página em branco

Índice Geral

Introdução Teórica	9
Objectivos	10
Métodos	11
<i>Modelo Animal</i>	<i>11</i>
<i>Protocolo Anestésico</i>	<i>11</i>
<i>Protocolo Cirúrgico</i>	<i>11</i>
<i>Variáveis Registadas:</i>	<i>12</i>
<i>Protocolo experimental:</i>	<i>12</i>
<i>Protocolo Histológico (por realizar)</i>	<i>13</i>
<i>Análise de resultados (por realizar)</i>	<i>13</i>
Resultados	15
Discussão e Conclusões	16
Bibliografia	18
Anexos	19
<i>Anexo 1 - Parecer de Acompanhamento e Avaliação do Tutor</i>	<i>20</i>
<i>Anexo 2 - Relatório de Execução Financeira</i>	<i>20</i>
<i>Anexo 3 - Histórico escolar</i>	<i>22</i>
<i>Anexo 4 - Indicações para a Apresentação: Poster/Apresentação</i>	<i>25</i>

Abreviaturas

<i>ECG</i>	<i>Electrocardiograma</i>
<i>FC</i>	<i>Frequência Cardíaca</i>
<i>NEW</i>	<i>Núcleo de Edinger-Westphal</i>
<i>PA</i>	<i>Pressão Arterial</i>
<i>PIO</i>	<i>Pressão Intraocular</i>

“Diversity of opinion about a work of art shows that the work is new, complex, and vital.

When critics disagree the artist is in accord with himself.”

in The Picture of Dorian Gray, Oscar Wilde

página em branco

Introdução Teórica

O Glaucoma é uma das principais causas de perda de visão irreversível no mundo ocidental a partir da quarta década de vida. A Organização Mundial de Saúde estima que, desde 2002, 12,3% dos casos de cegueira tenham como causa o glaucoma, sabendo-se que esta é uma patologia que está subdiagnosticada.

Em termos gerais, o Glaucoma caracteriza-se pela perda de células ganglionares da retina levando progressivamente à perda de campo visual e, em estádios mais avançados, à cegueira. Os mecanismos fisiopatológicos da doença são, em alguns aspectos, desconhecidos. De acordo com classificações internacionais o Glaucoma pode, em termos genéricos, dividir-se em Glaucoma Primário – de ângulo aberto ou ângulo fechado – ou Secundário quando cursa secundariamente a outras patologias, dependendo a prevalência e o seu tipo de características regionais. Na Europa, a maior prevalência é para o Glaucoma Primário de ângulo aberto. Existem estudos que mostram a existência de uma relação entre glaucoma e doença sistémica, em particular, cardiovascular. De facto, os doentes com Glaucoma apresentam uma maior probabilidade de apresentarem alterações vasculares na circulação ocular e na circulação sistémica induzidas por lesões arterioscleróticas e, tanto a hipo como a hipertensão arteriais foram relacionadas com o glaucoma de ângulo aberto.

Por outro lado, a pressão intraocular (PIO) elevada é um dos factores de risco de Glaucoma embora ainda não tenha sido estabelecida entre os seus valores e a degeneração celular uma relação causal pois podem co-existir lesões ganglionares para valores altos ou valores baixos de pressão intraocular e, ainda, valores altos de pressão intraocular podem não co-existir com alterações ganglionares. De qualquer forma, e em relação à etiopatogenia do Glaucoma, é hoje aceite a existência de uma complementaridade entre os factores mecânicos e os factores vasculares que determinará o dano nervoso e, conseqüentemente, a perda de campo visual. O recurso a modelos animais para o estudo do Glaucoma e da sua etiopatogenia tem sido crescente nos últimos anos até porque, em termos de terapêutica, que tem como alvo a PIO, ainda não são bem conhecidos alguns aspectos cinéticos e farmacológicos de alguns fármacos. Inicialmente, os animais utilizados no estudo do Glaucoma foram os primatas pela sua semelhança com o Homem, mas dadas as evidentes repercussões éticas e económicas, hoje prevalece a utilização do rato como modelo animal para o estudo do Glaucoma e das

repercussões ganglionares das variações, quer induzidas, quer geneticamente determinadas, da PIO, para registo nervoso da actividade eléctrica da retina, para avaliação da morte celular por hipertensão ocular, assim como para teste de diversos fármacos ou de sistemas de registo de diferentes variáveis oculares e sistémicas em modelos de hipertensão ocular ou glaucoma.

A avaliação autonómica através do processamento de sinais fisiológicos permite observar modificações do fluxo simpático e parassimpático quando se efectua uma manobra de provocação autonómica, como a Prova de Água ou a Estimulação do NEW. Diversos estudos têm usado a transformada de Fourier, onde se obtém um espectro de frequências, no qual se distinguem duas bandas, as baixas frequências (LF) e as altas frequências (HF), estando a primeira relacionada principalmente com a activação do Sistema Nervoso Simpático e a segunda com a activação do Sistema Nervoso Parassimpático. No entanto, devido às limitações do uso da análise de Fourier, como a exigência de um período de tempo de registo longo e da estacionaridade do sinal, outra metodologia é utilizada paralelamente, a análise de wavelet.

Objectivos

Criação de um modelo animal (rato) para o estudo de variações de PIO induzidas mecanicamente.

Métodos

Modelo Animal

Ratos Wistar, machos e fêmeas, adultos.

Protocolo Anestésico

Os animais foram anestesiados com dose inicial de pentobarbital de sódio (60mg/ml/Kg, intra-peritoneal). Sempre que necessário, foi administrada dose de manutenção a 100% (v/v) do mesmo fármaco (intra-venoso), após o teste do reflexo de retirada ou através das modificações de PA e FC.

Protocolo Cirúrgico

A temperatura rectal foi mantida entre 36,5-39°C através de um cobertor homeotérmico, sobre o qual o animal se encontrava em decúbito dorsal, ligado a uma sonda rectal (*Harvard Apparatus*).

A artéria e a veia femorais foram cateterizadas para monitorização da Pressão Arterial (*Neurolog, Digitimer*) e administração de soro e fármacos, respectivamente.

O ECG foi obtido por inserção de eléctrodos subcutâneos em três dos quatro membros (*Neurolog, Digitimer*).

Realizou-se uma traqueostomia baixa para ventilação artificial de forma a obter uma percentagem de CO₂ no ar expirado entre 4,5-5,0%.

Posteriormente os animais foram colocados em decúbito ventral e estabilizados num fixador estereotáxico para se aceder ao globo ocular e ao NEW.

Através de craniotomia com coordenadas aproximadas de -6mm no eixo sagital, 1mm no eixo coronal, 5,7mm no eixo rostro-caudal, com fixador a 10°, colocou-se electrodo bipolar no NEW, posteriormente confirmado por histologia. O estímulo eléctrico

foi gerado na fonte de sinal *A.M.P.I. MASTER-8* e no modelador de corrente *A.M.P.I.@ISO-Flex*.

Através do micrómetro, introduziu-se na câmara anterior do olho uma micropipeta feita no *Flaming Brown micropipette puller*. A inserção foi feita segundo um plano horizontal, a partir do ângulo externo da fenda palpebral e formando 45° com a córnea. O cateter estava ligado a um transdutor para registar a PIO.

Variáveis Registadas:

Registaram-se continuamente a PA, PIO e ECG. Os sinais de cada uma das variáveis foram amplificados (*Neurolog, Digitimer*), filtrados (*Neurolog, Digitimer*) e adquiridos a 500 Hz (*PowerLab*). Todos os sinais foram digitalizados e guardados em suporte informático. A análise do registo de sinal foi realizada *off-line* recorrendo a software apropriado.

Protocolo experimental:

Protocolo 1 - Recolha dos valores de PIO no olho de rato normal

Num grupo de 5 ratos normais (n=5) foram realizados todos os procedimentos supracitados, incluindo registo de PA, ECG e PIO pré e pós 3 estimulações eléctricas do NEW (50Hz, 1ms, 100-150 μ A, trains 5-10s).

Seguidamente procedeu-se à marcação do território estimulado, através de electroestimulação de longa duração e longa intensidade.

No final da experiência, procedeu-se à eutanásia do animal, com uma overdose de anestésico, seguida da remoção do encéfalo e posterior fixação em formol a 10% para confirmação histológica.

Na execução do protocolo experimental foi cumprida a legislação nacional e comunitária sobre experimentação animal.

Protocolo 2 - Recolha dos valores de PIO no olho de rato em modelo animal de hipertensão ocular por fotocoagulação do ângulo irido-esclero-corneano e das veias epiesclerais (por realizar)

Num grupo de 10 ratos (n=10), irão ser realizador dois procedimentos consecutivos: o primeiro, onde os animais serão anestesiados segundo o protocolo supracitado e o ângulo irido-esclerocorneano e as veias epiesclerais serão fotocoagulados com laser monocromático 516nm; o segundo, que segue o *Protocolo 1* supracitado.

Seguidamente proceder-se-á à marcação do território estimulado, através de electroestimulação de longa duração e longa intensidade.

No final da experiência, proceder-se-á à eutanásia do animal, com uma overdose de anestésico, seguida da remoção do encéfalo e posterior fixação em formol a 10% para confirmação histológica.

Na execução do protocolo experimental irá ser cumprida a legislação nacional e comunitária sobre experimentação animal.

Protocolo Histológico (por realizar)

Depois de marcado o território estimulado e fixado o encéfalo em formol a 10% irá ser realizada a preparação histológica do encéfalo dos ratos de ambos os protocolos para confirmação histológica do NEW, com secções de 80 μ m, seriadas, coradas com vermelho neutro e observadas a microscopia óptica.

Análise de resultados (por realizar)

O processamento dos sinais biológicos será realizado *off-line* através do programa *LabChart 6*[®]. Utilizando a aplicação pré-definida “*cyclic measurements*” e a ferramenta “*preview of detected cycles*”, obteve-se a partir da PA, a FC e a pressão arterial média. Obter-se-á a PP calculando a diferença entre a pressão arterial média e a PIO.

De forma a comparar as alterações provocadas pela estimulação, os resultados irão ser analisados no estado basal e no momento de resposta máxima ao estímulo.

Para análise no domínio tempo-frequência da PA e PIO utilizar-se-á o software *MatLab* R2009b® e o programa *FisioSinal*®. Irá ser seleccionado um período estável, com a duração de 5 minutos, tanto no estado pré-estimulação, como no pós-estimulação e irão ser comparados ambos, utilizando a transformada rápida de Fourier (FFT). Para a análise de Wavelet irão ser seleccionados 30 segundos do momento da estimulação, o qual se sub-analisará em secções de 10 segundos de forma a comparar as variáveis antes e após a estimulação

O cálculo e análise estatística irão ser executados com o software GraphPad InStat® e GraphPad Prisma®, usando-se o teste t-Student (valor-p) para dados emparelhados e irão ser consideradas significativas as diferenças quando $p < 0,05$. Os resultados irão ser expressos como média \pm desvio padrão.

Resultados

Das 9 experiências realizadas até à data, em uma apenas (PIO-NEW 09) foi possível completar o protocolo anestésico, cirúrgico e experimental sem intercorrências, tendo sido validadas 3 estimulações do NEW. Nas restantes 8 experiências não foi possível completar os protocolos, por morte de causa desconhecida do animal ou por dificuldades técnicas na medição da PIO.

Na experiência PIO-NEW 09, realizada dia 7 de Julho de 2010, com a duração de 203 minutos, todos os protocolos foram executados sem complicações, tendo sido realizadas 4 estimulações do NEW com os parâmetros predefinidos. Durante os períodos de estimulação do NEW com os parâmetros predefinidos, verificaram-se alterações com picos e vales da PIO consistente com um aumento da mesma. No período pós estimulação a PIO retomou gradualmente ao seu valor normal para o rato.

Este protocolo está incluído num protocolo interinstitucional entre a Unidade de Sistema Nervoso Autónomo e a Clínica Universitária de Oftalmologia. Só será possível proceder há fotocoagulação laser, para completar a construção do modelo animal de hipertensão ocular após o mês de Setembro de 2010, por motivo de disponibilidade da Clínica Universitária de Oftalmologia.

Discussão e Conclusões

Com as experiências executadas não existem dados necessários para que seja executado o tratamento dos dados. No entanto, o estudo continua a ser executado, de modo a que possam ser os objectivos previstos. Estes irão ser depois apresentadas sob formato a esclarecer.

Durante o período lectivo do ano 2009/2010, foram desenvolvidas diversas actividades no âmbito do projecto “Modelo animal para o estudo da fisiopatologia da hipertensão ocular - glaucoma”.

A execução do projecto iniciou-se no último trimestre de 2009 com um Curso de Utilização de Animais de Laboratório, onde foram obtidas competências nas áreas da manipulação de ratos Wistar e utilização de biotérios e, adicionalmente, conhecimentos na área da legislação para a utilização de animais de laboratório. Para este curso foram utilizados 10 ratos Wistar.

Posteriormente, iniciaram-se actividades práticas tutoriais em cirurgia animal, no Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Durante os dois primeiros meses do ano de 2010, foi possível a aprendizagem e o aperfeiçoamento de técnicas de dificuldade média, como a monitorização de variáveis biológicas, a anestesia animal, a fixação estereotaxica, a execução de provas fisiológicas, e de técnicas de dificuldade elevada, como a lesão com laser da via episcleral.

Seguidamente, durante o período de Março, Abril, Maio, Junho e Julho de 2010, foram executadas 9 experiências, de PIO-NEW \varnothing 1 a PIO-NEW \varnothing 9, onde se tinha como objectivo completar todos os protocolos supracitados, sendo o protocolo experimental o *Protocolo 1*. No entanto, por dificuldades inerentes às técnicas aplicadas, por dificuldades de monitorização e recolha de sinal e por imprevistos inerentes à utilização de modelos animais (ex.: morte de causa desconhecida), apenas na última experiência o protocolo experimental foi considerado válido e foram recolhidos dados para análise posterior.

O protocolo experimental *Protocolo 2* não foi realizado até à data actual devido a não ter sido finalizado o protocolo experimental *Protocolo 1*.

Bibliografia

Brubaker RF, Nagataki S, Townsend DJ et al. The effect of age on aqueous humor formation in man. *Ophthalmology*, 1981, 88(3): 283-288;

Caprioli J. Intraocular pressure fluctuations: an independent risk factor for glaucoma? *Arch Ophthalmology*, 2007, 125(8): 1124-1125;

David R, Zangwill I, Briscoe D et al. Diurnal intraocular pressure variations: na analysis of 690 diurnal curves. *Br J Ophthalmology*, 1992, 76(5): 280-283;

Gabelt BT & Kaufmann PT. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 2005, 24(5): 612-637;

Gelatt KN, Peiffer RL Jr, Gwin RM, Gum GG, Williams LW. Clinical manifestations of inherited glaucoma in the beagle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16: 1135-1142;

Kolker AE, Moses RA, Constant MA, Becker B. The development of glaucoma in rabbits. *Invest Ophthalmol* 1963; 2: 316-321;

Morrison JC & Pollack. The glaucomas.. In *Glaucoma Science & Practice* . Ed Morrison & Pollack, Thieme, 2003, pp 150;

Morrison JC, Freddo TF & Toris C. Determinants of intraocular pressure. In *Glaucoma Science & Practice* . Ed Morrison & Pollack, Thieme, 2003, pp 24;

Nolan W & Yip JLY. Prevalence and geographical variation of glaucoma. In *Glaucoma: Medical Diagnosis and therapeutics*. Ed Shaarway, Sherwood, Hitcchings & Crowston. Saunders, 2009, pp12;

Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, Urcola H, Hernández-Barbáchano E, Araiz J, et al. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res* 2005; 81: 561-569;

Vecino E. Animal models of in the study of the glaucoma: past, present and future. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 2008, 83: 517-520.

Anexos

Anexo 1 - Relatório de Execução Financeira

	Unid.	Preço por Unidade	Total (em euros)
Consumíveis	-	-	117
Rato Wistar	9	13	117
Pentobarbital de sódio i.v.	5	*	*
Lidocaina tópica	1	*	*
Heparina i.v.	1	*	*
Seringa 1mL	20	*	*
Seringa 5mL	20	*	*
Agulhas subcutâneas	9	*	*
Lâmina de bisturi	9	*	*
Luvas de latex	18	*	*
Batas de laboratório	9	*	*
Sacos de plástico para lixo biológico	9	*	*
Sacos de plástico para lixo normal	9	*	*
Sacos de plástico para cadáver	9	*	*
Linha de sutura	1	*	*
Agrafos de sutura	3	*	*
Água destilada	1	*	*
Soro Fisiológico	2	*	*
Cotonetes	1	*	*
Vaselina gel	1	*	*
Eléctrodo bipolar	1	*	*
Electrocateter	9	*	*
Serviços	-	-	585
Serviço de Biotério (diária por rato)	360	1	360
Serviço de Laboratório (hora)	45	5	225

	Unid.	Preço por Unidade	Total (em euros)
<u>Bibliografia</u>	-	-	64
TOTAL	-	-	766

*Preço indisponível

Anexo 3 - Indicações para a Apresentação:

O projecto será apresentado no formato de Póster em Inglês.