

Estudio Comparativo *In-Vitro* de la Seguridad de las Drogas Antiangiogénicas (Bevacizumab y Ranibizumab) en Células Retinales

ANA LAURA GRAMAJO^{1,2}, ANEESH NEEKHRA³, M. CRISTINA KENNEY²,
BARUCH D. KUPPERMANN², CLAUDIO P. JUAREZ^{1*}, JOSÉ D. LUNA^{1*}

Resumen

PROPÓSITO. Comparar el perfil de seguridad de bevacizumab (Avastin™) y ranibizumab (Lucentis™) en células retinales cultivadas.

MÉTODOS. Células ARPE-19 y R28 fueron expuestas por 24 hrs. a bevacizumab o ranibizumab a 1X, 2X y 5X las dosis clínicas intravítreas (1.25, 2.5, y 6.25mg para bevacizumab y 0.5, 1.0 y 2.5mg para ranibizumab). Cambios apoptóticos tempranos fueron determinados por el test de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Para valorar apoptosis tardía, se midió la actividad de caspasa-3/7. Estudios de viabilidad celular fueron realizados usando el test de exclusión con azul de tripano.

RESULTADOS. En ambas líneas celulares, el $\Delta\Psi_m$ disminuyó significativamente en cultivos tratados con bevacizumab 5X comparado con cultivos tratados con ranibizumab y cultivos no tratados ($p < 0.001$). A la dosis de 2X, los cultivos tratados con bevacizumab presentaron un $\Delta\Psi_m$ menor comparado con cultivos no tratados ($p < 0.05$). A las dosis clínicas de 1X y 2X, no se evidenció diferencia significativa entre ambas drogas. La actividad de caspasa-3/7 se incrementó sólo en cultivos celulares de R28 tratados con bevacizumab 5X ($p < 0.001$). La viabilidad celular no se redujo a ninguna dosis de ranibizumab o bevacizumab comparada con controles en ambas líneas celulares.

CONCLUSIONES. Tanto bevacizumab como ranibizumab no produjeron cambios en la viabilidad celular o cambios apoptóticos en las células retinales *in vitro* a las dosis clínicas intravítreas. Bevacizumab causó cambios apoptóticos significativos en ambas líneas celulares a dosis supraclínicas. En contraste, ranibizumab no causó una activación de la apoptosis en ninguna línea celular a ninguna de las dosis empleadas en este estudio. *OFTALMOL CLIN EXP 2007;1: 4-10*

PALABRAS CLAVES: Avastin, Lucentis, bevacizumab, ranibizumab, viabilidad celular, toxicidad *in-vitro*, células neurosensoriales y del epitelio pigmentario de la retina.

In-Vitro Comparative Study of Antiangiogenic Drugs (Becavizumab and Ranibizumab) On Retinal Cells

ABSTRACT

PURPOSE. To compare the safety profile of bevacizumab (Avastin™) and ranibizumab (Lucentis™) on retinal cells (R28 /ARPE-19) in culture.

METHODS. Confluent cultures of ARPE-19 and R28 cells were exposed for 24 hrs to bevacizumab or ranibizumab at 1X, 2X, and 5X the intravitreal clinical doses (1.25, 2.5, and 6.25mg for bevacizumab and 0.5, 1.0 and 2.5mg for ranibizumab). Early apoptotic changes were determined by the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) assay. To assess the downstream apoptotic pathway, caspase-3/7 activity was measured. Cell viability studies were performed using the trypan blue dye exclusion assay.

RESULTS. In both cell lines, $\Delta\Psi_m$ was decreased significantly in the 5X bevacizumab-treated cultures compared to ranibizumab and untreated cultures ($p < 0.001$). At the 2X dose, bevacizumab-treated cultures had lower $\Delta\Psi_m$ compared to untreated cultures ($p < 0.05$). At 1X and 2X doses, there was no significant difference seen between bevacizumab and ranibizumab. The caspase-3/7 activity was increased only in the 5X R28 bevacizumab-treated cultures ($p < 0.001$). Cell viability was not reduced for any dose of ranibizumab or bevacizumab compared to controls in both cell lines.

CONCLUSIONS. Neither bevacizumab nor ranibizumab produced apoptotic or cell viability changes to *in vitro* retinal cells at clinical intravitreal doses. Bevacizumab caused significant early apoptotic changes in both ARPE-19 and R28 cell lines at the 2X and 5X clinical doses and late apoptotic changes at the 5X dose in R28 cells. In contrast, ranibizumab caused neither early nor late apoptotic upregulation in either retinal cell line at all doses tested. *OFTALMOL CLIN EXP 2007;1: 4-10*

KEY WORDS: Avastin, Lucentis, bevacizumab, ranibizumab, cell viability, *in-vitro* toxicity, neurosensory retinal cells, retinal pigment epithelial cells.

Los autores no tienen interés comercial en este estudio. Subsidado por Research to Prevent Blindness, The Discovery Eye Foundation, the Iris and B. Gerald Cantor Foundation and Pan-American Association of Ophthalmology Foundation (David & Julianna Pyott Pan-American - Retinal Research Fellowship)

Recibido: 4/04/2008

Aceptado: 25/04/2008

¹ Departamento de Oftalmología,
Centro Privado de Ojos Romagosa
Fundación VER, Córdoba, Argentina.

² Department of Ophthalmology, University
of California, Irvine, California.
³ Ophthalmology & Visual Sciences,
University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

*Autores responsables: C. P. Juárez, MD, Departamento de
oftalmología, Fundación VER, y José D. Luna, MD, Departamento
de oftalmología, Fundación VER, Dean Funes 432, (5000)
Córdoba, Argentina. fundacionver@gmail.com

La angiogénesis vascular es uno de los mecanismos básicos involucrados en el desarrollo de la degeneración macular.¹ Uno de los factores de crecimiento detrás de la neovascularización, el factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (por sus siglas en inglés), ha sido ampliamente estudiado y ha sido implicado en varios eventos patológicos de la angiogénesis incluyendo enfermedades oculares neovasculares.²⁻¹⁵ La presencia de VEGF se requiere para la formación de neovascularización coroidea (NVC) en la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE).¹¹ Con el esclarecimiento del rol causal de este factor en la AMD neovascular, varias drogas que actúan sobre el VEGF han sido desarrolladas y otras están siendo sometidas a ensayos clínicos. En 2006, ranibizumab, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado, fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la AMD. Sin embargo, en 2004 bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado de longitud total, contra todas las isoformas de VEGF-A y sus productos de degradación activa, fue aprobado para el tratamiento del cáncer colorectal metastático mediante infusión endovenosa.¹⁶⁻¹⁷ La falta de éxito en el tratamiento de la DMRE y la disponibilidad del anticuerpo completo anti-VEGF llevó al Doctor Philip Rosenfeld a usarlo "off label" (sin la aprobación específica de los organismos oficiales- FDA) primero en forma endovenosa y luego como un agente intravítreo para la DMRE neovascular. Se descubrió que bevacizumab era efectivo en mejorar la visión y reducir el grosor macular en una pequeña serie de casos.¹⁸ Desde el reporte inicial de su eficacia, bevacizumab ha sido usado ampliamente por especialistas en retina a lo largo de todo el mundo. Se observó además su utilidad en el tratamiento de retinopatía diabética proliferativa¹⁹, oclusión de vena central de la retina²⁰⁻²¹, edema macular pseudofáquico²² y neovascularización de iris.²³⁻²⁴

El crecimiento del uso off-label de bevacizumab intravítreo en el año previo a la disponibilidad de ranibizumab creó una controversia significativa entre los especialistas en retina, particularmente desde que la FDA aprobó ranibizumab para la DMRE neovascular. Dado que bevacizumab fue desarrollado sólo para uso endovenoso, muchas preguntas surgieron acerca de la seguridad del uso intravítreo off-label de bevacizumab. Mientras esta droga parece ser clínicamente segura y efectiva en gran escala en su uso intravítreo, existe una falta de datos sobre su seguridad y eficacia que usualmente estaría disponible para una droga aprobada para administración intraocular. Estudios preliminares *in vitro*²⁵ e *in vivo*²⁶⁻²⁸ conducidos con bevacizumab no mostraron signos de toxicidad en células oculares. Las preocupaciones asociadas a la seguridad del uso off-label de este anticuerpo son importantes de explorar en vista del potencial impacto en la salud de las enfermedades oculares relacionada con la edad.²⁹

Previamente demostramos que bevacizumab no es tóxico a células de retina en cultivo (células R28 retinales neurosensoriales de rata y células ARPE-19 humanas del epitelio pigmentario,) al estudiarlas con el test de viabilidad celular de exclusión con tinción de azul trypan luego de 24 horas de exposición a la droga.²⁵ Sin embargo, el test de azul trypan mide sólo muerte celular absoluta. Tests más sensibles de injuria celular o mitocondrial podrían ser mejores marcadores de disfunción o muerte celular final dadas las limitaciones de tiempo de los trabajos en cultivos celulares. Si bien hay muchos tests sensibles disponibles para valorar daño celular, decidimos enfocarnos en dos: el test JC-1 el cual mide los cambios apoptóticos tempranos y el análisis de caspasa-3, una medida de la regulación en las vías finales de apoptosis.

Por lo tanto, este estudio tiene dos objetivos específicos: 1) comparar la toxicidad de bevacizumab y ranibizumab en células retinales en cultivo y 2) valorar tests *in vitro* más sensible para buscar daño mitocondrial o celular tempranos y no solo muerte celular y así evaluar el potencial de toxicidad retinal de estos dos importantes agentes terapéuticos.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Las células neurosensoriales retinales (R28) se obtuvieron de retinas de rata de 6 días post-nacimiento.³⁰ Son células progenitoras retinales postnatales conocidas por sus propiedades funcionales neuronales similares a varias células neurosensoriales retinales humanas.³¹ Las células fueron cultivadas en Dulbecco's modified Eagle's medium, con alta glucosa (DMEM high glucose; Invitrogen-Gibco) con suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 10 mM y 10µg/ml de gentamicina.

Las células del epitelio pigmentario retinal humano (células ARPE-19, ATCC, Manassas, VA) crecieron en una mezcla 1:1 (vol./vol.) de Dulbecco's modified Eagle's y Ham's nutrient mixture F-12 medium (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA), aminoácidos no esenciales 10mM, bicarbonato de sodio 0.37%, L-glutamina 0.058%, antibióticos (penicilina G 100U/ml, sulfato de estreptomina 0.1 mg/ml, gentamicina 10µg/ml y anfotericina-B 2.5 µg/ml) y suero bovino fetal 10%.

Ambos tipos celulares fueron incubadas a 37°C en 5% CO₂ hasta lograr confluencia. Luego fueron incubadas por otras 24 horas en medio libre de suero para lograr que dichas células alcanzaran un estado relativamente quiescente para simular el estado natural de las células neurosensoriales retinales humanas y de las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) las cuales permanecen en fase no proliferativa. Esto fue seguido por 24 horas de exposición a los respectivos anticuerpos.

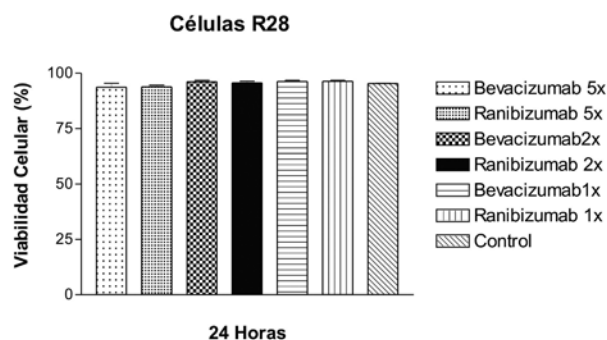


Figure 1A

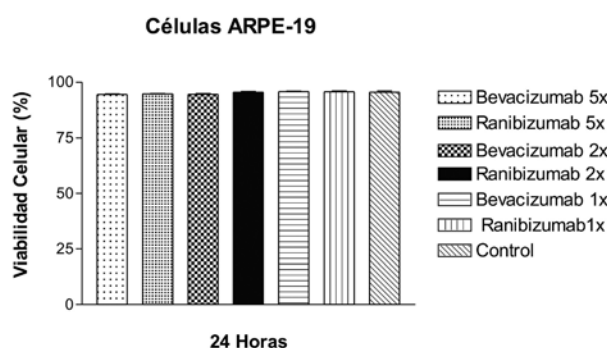


Figure 1B

Figura 1A. Test de viabilidad en células retinales neurosensoriales R28. No se observó una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad en células R28 tratadas con 1X, 2X, y 5X las dosis clínicas de bevacizumab o 1X, 2X, y 5X las dosis clínicas de ranibizumab cuando se las compara a las células controles no tratadas, $p > 0.05$.

Figura 1B. Test de viabilidad en células retinales del epitelio pigmentario ARPE-19. No se observó una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad en células ARPE-19 tratadas con 1X, 2X, y 5X las dosis clínicas de bevacizumab o 1X, 2X, y 5X las dosis clínicas de ranibizumab comparadas a las células controles no tratadas, $p > 0.05$.

Exposición celular a Bevacizumab y Ranibizumab

Las células ARPE-19 y R28 fueron incubadas por 24 horas en medio libre de suero con las dosis clínicas de bevacizumab (Avastin™, Genentech, San Francisco, CA) de 1.25, 2.5 y 6.25 mg o 0.5, 1.0 y 2.5 mg de ranibizumab (Lucentis™, Genentech, San Francisco, CA). Estas dosis son equivalentes a 1X, 2X y 5X las dosis clínicas intravítreas de ambos anticuerpos. Asumimos que las dosis previamente mencionadas, cuando son usadas clínicamente, se distribuyen en forma uniforme a través de los 4 ml de vítreo humano, resultando en concentraciones de un cuarto las dosis mencionadas en mg/ml. Por lo tanto, las células fueron expuestas a 0.313, 0.625, y 1.563 mg/ml bevacizumab y 0.125, 0.25, y 0.625 ranibizumab. Ranibizumab, distribuido como una solución estéril, libre de conservantes creada para uso intravítreo que contiene 10 mg/ml de

solución acuosa ranibizumab con 10 mM histidina HCl, 10% α , 0.01% polisorbato 20, pH 5.5. Bevacizumab es envasado como una solución libre de conservantes de 100 o 400 mg creada para uso endovenoso. La solución de 100 mg contiene 25 mg/ml de solución acuosa bevacizumab junto con 23.2 mg fosfato sódico (monobásico, monohidrato), 4.8 mg fosfato sódico, 1.6 mg polisorbato 20, y agua para inyección, USP, pH 6.2. El producto de 400 mg está formulado con las mismas concentraciones químicas.

Test de Viabilidad Celular / Prueba de exclusión con Azul Tripan

Las células R28 y ARPE-19 (6.0×10^5) se cultivaron durante toda la noche para ser luego expuestas por otras 24 horas a una de las tres concentraciones de bevacizumab o ranibizumab en medio libre de suero para mantener las células en una fase no proliferativa. Las células fueron luego sometidas a tripsinación por 5 minutos con tripsina-EDTA 0.2%, luego de lavar las mismas con PBS-EDTA. Acto seguido fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo. Inmediatamente después, se realizó el test de viabilidad celular usando el ViCell™ analyzer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) en el cual la nueva suspensión de células es incubada con el colorante azul Tripan. El principio de este analizador se basa en que las células muertas captan el colorante, mientras que las células vivas no lo hacen, ya que el colorante se une a las proteínas intracelulares de las células muertas por presentar una membrana celular permeable. El analizador realiza una prueba de exclusión colorimétrica automatizada con el colorante azul de tripano otorgando al final el porcentaje de células viables.

Test de Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Las células R28 y ARPE-19 (1.5×10^5) fueron cultivadas durante toda la noche y luego incubadas por otras 24 horas con una de las tres concentraciones de bevacizumab o ranibizumab en medio libre de suero.

La detección del potencial de membrana fue realizado usando el kit JC-1 para detección de potencial de membrana mitocondrial (Biotium, Hayward, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolil-carbocianin-iodado) es un colorante catiónico. Se acumula mientras se agrega a las membranas mitocondriales, resultando en una fluorescencia roja (de 590 nm) en células saludables mientras en células apoptóticas y necróticas, las cuales presentan un potencial de membrana mitocondrial disminuido, JC-1 se presenta en la forma de un monomero fluorescente verde (529 nm). La relación de fluorescencia roja (células vivas) y

verde (células muertas) es medido en cada muestra.

Al finalizar las 24 horas de incubación con la droga, las células fueron lavadas con medio fresco e incubadas por 15 minutos con 500 μ l de solución del reactivo JC-1 en medio de cultivo. Esto fue seguido de lavado con buffer incluido en el kit. Las imágenes fueron capturadas usando una Unidad de Escaneo de Imágenes Fluorescentes (FM-BIO III, Hitachi, Yokohama, Japan). La fluorescencia roja y verde fue medida en cada well y los índices rojo/ verde fueron calculados.

Detección de Caspasa-3/7

Las células R28 y ARPE-19 (1.5×10^5) fueron cultivadas durante toda la noche en platos de 24 wells y luego incubadas por otras 24 horas con una de las tres concentraciones de bevacizumab o ranibizumab en medio libre de suero.

La actividad de Caspasa-3/7 fue detectada usando kits de Detección de Apoptosis FLICA (Fluorochrome Inhibitor of Caspasa) (Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, MN). El reactivo FLICA tiene un rango de excitación óptima de 488 a 492 nm, y un rango de emisión de 515 a 535 nm. Las actividades de caspasa-3/7 fueron medidas usando un FMBIO III. La apoptosis fue cuantificada como la cantidad de fluorescencia verde emitida por las sondas FLICA ligadas a caspasa-3/7. Las células no apoptóticas no expresan tinción mientras que las células que están sufriendo apoptosis fluorescen brillantemente.

A las 24 horas, las células fueron lavadas brevemente con medio de cultivo fresco, seguido por incubación con 300 μ l de solución FLICA en medio de cultivo por una 1 hr y lavadas con buffer fosfato (PBS). En adición a los grupos experimentales, los grupos controles incluyeron 1) células no tratadas sin FLICA para medir autofluorescencia de base de la célula nativa; 2) células no tratadas con FLICA para determinar actividad de caspasa nativa en los grupos celulares; y 3) sólo buffer.

Análisis Estadístico

Los datos fueron sujetos a análisis estadístico mediante ANOVA usando el programa estadístico GraphPad Prism™ versión 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). El Test de Comparación Múltiple de Newman-Keuls fue usado para comparar los datos dentro de cada experimento. Los datos se presentan como media \pm errores estándares de la media (SEM). Los experimentos fueron realizados en triplicado. Los valores $p <$ 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Test de Viabilidad Celular

Se constató que ambas drogas fueron seguras a todas las

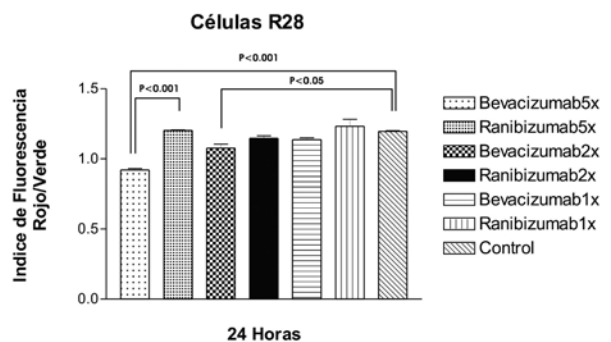


Figure 2A

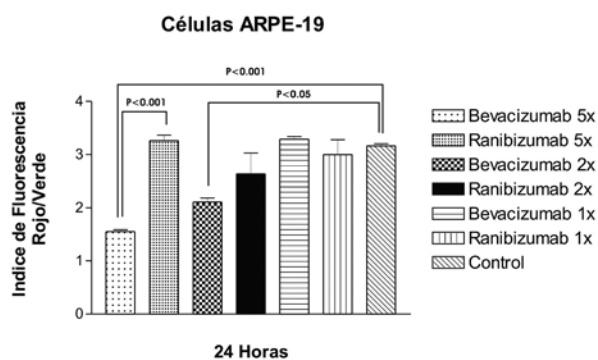


Figure 2B

Figura 2A. Test de potencial de membrana mitocondrial en células R28.

Se observó un índice rojo/verde significativamente bajo con el test JC-1 a 24hrs en células R28 tratadas con 5X y 2X las dosis clínicas de bevacizumab cuando se las comparó a los controles no tratados ($p <$ 0.001 y $p <$ 0.05 respectivamente). Un índice rojo/verde significativamente bajo se observó además en células tratadas con 5X la dosis clínica de bevacizumab cuando se las comparó con la misma dosis de ranibizumab, $p <$ 0.001. No se evidenciaron cambios significativos en el $\Delta\Psi_m$ a 1X la dosis clínica de bevacizumab o 1X, 2X, y 5X las dosis clínicas de ranibizumab en células R28 a 24hrs ($p >$ 0.05).

Figura 2B. Test de potencial de membrana mitocondrial en células ARPE-19.

Se observó un índice rojo/verde significativamente bajo con el test JC-1 a 24hrs en células ARPE-19 tratadas con 5X y 2X las dosis clínicas de bevacizumab cuando se las comparó a los controles no tratados ($p <$ 0.001 y $p <$ 0.05 respectivamente). Un índice rojo/verde significativamente bajo se observó además en células tratadas con 5X la dosis clínica de bevacizumab cuando se las comparó con la misma dosis de ranibizumab, $p <$ 0.001. No se evidenciaron cambios significativos en el $\Delta\Psi_m$ a 1X la dosis clínica de bevacizumab o 1X, 2X, y 5X las dosis clínicas de ranibizumab en células ARPE-19 a 24hrs ($p >$ 0.05).

concentraciones testeadas en ambas líneas celulares retinales a 24hrs usando el test de viabilidad celular de exclusión con azul trypan (Figuras 1A y 1B).

Células R28: La viabilidad de las células R28 cuando fueron tratadas con concentraciones de bevacizumab de 5X, 2X y 1X fue $93.7 \pm 3.0\%$, $96.1 \pm 1.15\%$ y $96.3 \pm 0.9\%$ ($p >$ 0.05) respectivamente. La viabilidad media de esta línea celular cuando se la expuso a 5X, 2X y 1X ranibizumab fue $93.8 \pm 1.5\%$, $95.6 \pm 1.4\%$ y $96.3 \pm 0.7\%$ ($p >$ 0.05) respectivamente. Las viabilidades a 24hrs de los

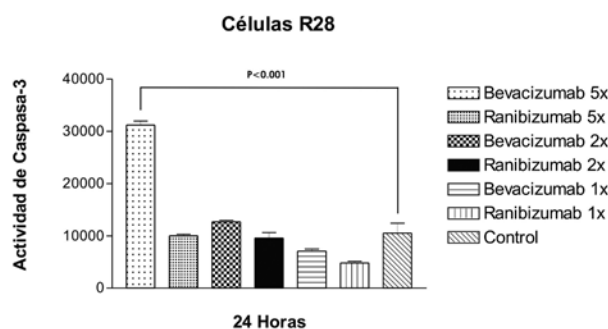


Figure 3A

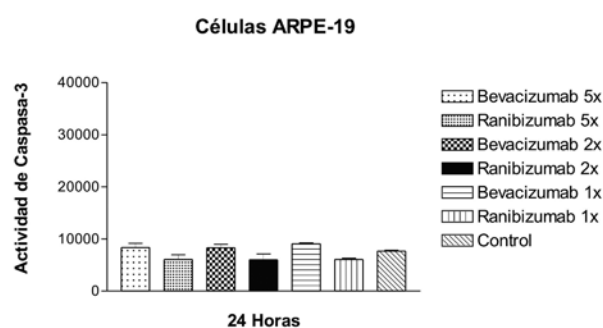


Figure 3B

Figura 3A. Test de caspasa-3/7 assay en células R28. Se evidenció un incremento significativo en la actividad de caspasa-3/7 a 5X la dosis clínica de bevacizumab cuando se comparó con los controles de células R28 no tratados, $p < 0.001$. No se constató una actividad de caspasa-3/7 significativa a 1X y 2X las dosis clínicas de bevacizumab o 1X, 2X, y 5X las dosis clínicas en los grupos celulares tratados con ranibizumab, $p > 0.05$.

Figura 3B. Test de caspasa-3/7 assay en células ARPE-19. No se constató una actividad de caspasa-3/7 significativa a ninguna de las dosis usadas en este estudio (1X, 2X, y 5X las dosis clínicas de bevacizumab y/o ranibizumab) en células ARPE-19 cuando se las comparó a los controles de células ARPE-19 no tratados, $p > 0.05$.

grupos tratados con drogas no fueron significativas entre ellas o en comparación a las células R28 no tratadas ($95.4 \pm 0.1\%$).

Células ARPE-19: Las viabilidades de las células ARPE-19 a concentraciones de bevacizumab de 5X, 2X, y 1X las dosis clínicas fueron $94.4 \pm 0.6\%$, $94.5 \pm 0.7\%$ y $95.7 \pm 0.5\%$ ($p > 0.05$) respectivamente. Las viabilidades de esta misma línea celular tratada por 24hrs con 5X, 2X y 1X ranibizumab fueron $94.7 \pm 0.3\%$, $95.5 \pm 0.5\%$ y $95.7 \pm 0.7\%$ (0.05%) respectivamente. A las 24hrs los grupos tratados con drogas no mostraron diferencias significativas, en la viabilidad, entre ellas o en comparación a las células ARPE-19 no tratadas ($95.5 \pm 1.0\%$).

Test de Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Células R28: El $\Delta\Psi_m$ se redujo significativamente en las células tratadas con bevacizumab a 5X y 2X de las dosis clínicas cuando se los comparó con los controles (Figura 2A). El índice de fluorescencia rojo/ verde ($\Delta\Psi_m$) fue 0.92 ± 0.02 ($p < 0.001$) para 5X y 1.07 ± 0.05 ($p < 0.05$) para 2X bevacizumab comparado con 1.20 ± 0.01 en las células R28 no tratadas. El potencial de membrana mitocondrial no fue estadísticamente diferente a 1X la dosis clínica de bevacizumab (1.14 ± 0.02 ; $p > 0.05$) comparado a células R28 no tratadas, a 24hrs.

Los valores de $\Delta\Psi_m$ en las células tratadas con ranibizumab a las tres dosis testeadas no fueron estadísticamente diferentes al grupo no tratado. Los valores a 24hrs fueron 1.20 ± 0.01 , 1.15 ± 0.03 y 1.23 ± 0.08 ($p > 0.05$) para las dosis clínicas de ranibizumab de 5X, 2X y 1X respectivamente, comparadas a 1.20 ± 0.005 de las células R28 no tratadas. Adicionalmente, la reducción observada en el $\Delta\Psi_m$ en las células tratadas con 5X bevacizumab (0.92 ± 0.02) fue estadísticamente significativa cuando se comparó con 5X ranibizumab (1.20 ± 0.005 ; $p < 0.001$). No hubo diferencia significativa entre las dos drogas a 2X y 1X de las dosis clínicas ($p > 0.05$).

Células ARPE-19: A 5X y 2X de las dosis clínicas de bevacizumab, el test de $\Delta\Psi_m$ se redujo significativamente en las células ARPE-19 cuando se las comparó a los controles (Figura 2B). En contraste, a las dosis de ranibizumab de 5X y 2X no se encontró una reducción significativa en esta línea celular. No se constataron cambios significativos en la fluorescencia en la dosis clínica de bevacizumab o ranibizumab de 1X cuando se lo comparó a células no tratadas. El índice de fluorescencia rojo/ verde en las células expuestas a dosis clínicas mayores de bevacizumab (5X, 2X y 1X) fue 1.5 ± 0.06 ($p < 0.001$), 2.1 ± 0.1 ($p < 0.05$), y 3.3 ± 0.08 ($p > 0.05$), respectivamente, comparado a 3.16 ± 0.06 en células ARPE-19 no tratadas. Para las dosis clínicas de ranibizumab de 5X, 2X y 1X, el $\Delta\Psi_m$ fue 3.2 ± 0.1 , 2.6 ± 0.7 , y 3.0 ± 0.5 ($p > 0.05$) respectivamente, a 24hrs. Adicionalmente, a la dosis de 5X, el $\Delta\Psi_m$ fue reducido significativamente ($p < 0.001$) en bevacizumab (1.5 ± 0.06) comparado a ranibizumab (3.2 ± 0.1). No se encontró diferencia estadística a dosis clínicas menores.

Detección de Caspasa-3/7

Células R28: Se detectó una elevación significativa en la actividad de caspasa-3/7 a 24hrs, en células R28 expuestas a 5X la dosis clínica de bevacizumab (Figura 3A). Los valores de fluorescencia fueron $31,197 \pm 1,285$ comparados a $10,516 \pm 3,316$ en células R28 no tratadas ($p < 0.001$). En contraste, ranibizumab no incrementó los niveles de caspasa-3/7 a la dosis clínica de 5X, con un valor promedio de $10,004 \pm 542$ ($p > 0.05$). No se evidenció una actividad de caspasa significativa, a 24 hrs, a las dosis clínicas de 2X

y 1X de ya sea bevacizumab o ranibizumab comparado con células no tratadas ($p > 0.05$). Los valores medios de fluorescencia fueron $12,689 \pm 489$ y $7,074 \pm 719$ para 2X y 1X las dosis clínicas de bevacizumab, respectivamente, y $9,569 \pm 1,843$ y $4,807 \pm 576$ para 2X y 1X las dosis clínicas de ranibizumab, respectivamente.

Células ARPE-19: No hubo una actividad significativa de caspasa-3/7 en las células ARPE-19 en cultivo a ninguna de las dosis utilizadas de bevacizumab o ranibizumab comparado a controles a 24hrs (Figura 3B). Los valores de fluorescencia a dicho período de tiempo fueron $8,356 \pm 1,396$; $8,267 \pm 1,202$ y $9,048 \pm 308$ para 5X, 2X y 1X de las dosis clínicas de bevacizumab y $6,043 \pm 1,578$; $5,977 \pm 1,946$ y $6,054 \pm 416$ para 5X, 2X y 1X las dosis clínicas de ranibizumab, respectivamente comparadas a $7,657 \pm 281$ en el grupo control de células ARPE-19 no tratadas ($p > 0.05$ en todos los grupos).

Discusion

Las dosis usadas en este experimento fueron las equivalentes a 1X, 2X y 5X las dosis clínicas intravítreas (1.25mg, 2.5mg, 6.25mg para bevacizumab y 0.5mg, 1.0mg, 2.5mg para ranibizumab). En nuestro conocimiento, este es el primer estudio *in vitro* comparativo entre las dos drogas el cual utiliza dosis clínicas y supra-clínicas en orden de valorar la toxicidad relativa *in vitro* de estos dos importantes componentes. Usando el análisis de viabilidad celular, el cual simplemente mide si las células están vivas o muertas, no se notó una diferencia significativa entre las dos drogas, y se encontró que ninguna de las líneas celulares fue afectada a las dosis clínicas de 1X, 2X y 5X cuando se las comparó a los controles no tratados. Los resultados de viabilidad celular vistos en el presente estudio en relación a bevacizumab son similares a nuestro reporte previo usando el mismo test.²⁵ Sin embargo, en otro trabajo de nuestro grupo donde se usó el test de dehidrogenasa mitocondrial WST-1 para medir la disfunción mitocondrial en lugar de muerte celular, los signos de toxicidad celular de las células neurosensoriales retinales R28 fueron evidentes a 2X y 4X las dosis clínicas de bevacizumab luego de 5 días de exposición (Luthra S, et al. ARVO 2007: Abstract 2197-B806). Esto nos llevó a evaluar el bevacizumab con otros tests más sensibles, como también a comparar esta droga con ranibizumab, para determinar si se observan cambios tempranos inducidos por esta droga.

Usamos el test de Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) para determinar los cambios apoptóticos tempranos dentro de las células. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial es un marcador de apoptosis temprana. Es un evento temprano que precede la externalización de la fosfatidilserina y que coincide con la activación de caspa-

sas.³²⁻³³ Ranibizumab no produjo ningún cambio significativo a las 24hrs en ninguna de las líneas celulares a ninguna de las dosis utilizadas en este estudio. Por el contrario, a 5X y 2X las dosis clínicas, bevacizumab produjo un descenso significativo en el índice de fluorescencia rojo/verde a 24hrs cuando se lo comparó a las células no tratadas. Spitzer y colaboradores³⁴ también reportaron los efectos nocivos de la exposición a 10mg de bevacizumab (equivalente a 2.5mg/ml, o 8X la dosis clínica) en células ARPE-19 a 24hrs usando el test de vida/muerte viabilidad/ citotoxicidad. Sin embargo, ellos no notaron ningún signo de citotoxicidad en células RGC5 (células ganglionares de la retina de rata) utilizando el mismo test. Tampoco detectaron toxicidad en células ARPE-19 o RGC5 usando el test de proliferación celular/ dehidrogenasa mitocondrial MTT.³⁴ Sin embargo, el test de dehidrogenasa mitocondrial MTT es menos sensible que test de potencial de membrana mitocondrial JC-1 usado en nuestro estudio.

El test para detección de caspasa-3/7 fue realizado para tratar de clarificar el mecanismo de citotoxicidad. Las caspasas son enzimas pro-activas las cuales son activadas en respuesta al stress. La activación de caspasa-3 representa un mecanismo bioquímico de desmantelamiento celular y es un marcador de apoptosis tardía.^{35a} 5 veces la dosis clínica de bevacizumab produjo un incremento significativo en la actividad de caspasa-3/7 en las células R28 cuando se las comparó a los controles, pero no hubo activación comparable de caspasa-3/7 a menores dosis de bevacizumab o a ninguna de las dosis de ranibizumab. Adicionalmente, no hubo activación significativa de caspasa-3/7 en las células ARPE-19 con ninguna de las drogas en ninguna de las dosis probadas en este estudio. Esto sugiere que las células neurosensoriales de la retina podrían ser más sensibles que las células del epitelio pigmentario a este componente.

El test de Viabilidad Celular y el test para detección de caspasa-3/7, marcadores de muerte celular y apoptosis tardía respectivamente, no mostraron ningún cambio citotóxico a 2X la dosis clínica de la solución bevacizumab. En contraste, el test de Potencial de Membrana Mitocondrial, un medidor de los cambios apoptóticos tempranos, sí exhibió efectos citotóxicos a esta dosis. Basado en los experimentos realizados aquí con el test de $\Delta\Psi_m$, la dosis clínica estándar de 1.25 mg de bevacizumab parece ser la dosis más segura de bevacizumab, mientras que ranibizumab en este estudio fue segura hasta 5X la dosis clínica estándar (la dosis más alta probada en estos experimentos). Más importante aun, en nuestro estudio se encontró que ambas drogas fueron seguras a 1X la dosis clínica usualmente utilizada en la práctica médica usando los tres ensayos utilizados.

Las razones para la diferencia en los rangos de seguridad de bevacizumab y ranibizumab son poco claras. Ciertamente, existen diferencias físicas en ambas moléculas y en

su proceso de fabricación y vehículos respectivos. La masa molecular del anticuerpo monoclonal de longitud total bevacizumab es 149 kDa mientras en ranibizumab es 48 kDa. Bevacizumab es producido en un sistema de expresión de células de ovario de hamsters chinos en un medio nutritivo que contiene el antibiótico gentamicina. Ranibizumab es producido por un sistema de expresión de *E. coli* en un medio nutritivo que contiene tetraciclina, aunque la misma no es detectable en el producto final. El ranibizumab es fabricado para uso intraocular mientras que bevacizumab es elaborado para uso sistémico como un factor anti-angiogénico en la terapia contra el cáncer. El vehículo de los dos componentes también es diferente. El vehículo de bevacizumab contiene fosfato sódico el cual no está presente en ranibizumab. Más aún, existe también una diferencia de pH entre los dos, siendo ranibizumab más ácido con un pH de 5.5 comparado a 6.2 de bevacizumab.

Los resultados experimentales *in vitro* pueden no ser necesariamente reproducidos *in vivo* donde múltiples factores protectores pueden influenciar el efecto final en las células retinales expuestas a bevacizumab. Sin embargo, este estudio demuestra que ni bevacizumab ni ranibizumab exhiben citotoxicidad retinal a dosis clínicas estándar en nuestro sistema de cultivo *in vitro*.

REFERENCIAS

- Garner A. Vascular diseases. In: Garner A, Klintworth GK, eds. Pathobiology of Ocular Disease. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1994:1625-1710.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: The trigger for neovascularization in the eye. *Lab Invest*. 1995; 72:615-618.
- Adamis AP, Aiello LP, D'Amato RA. Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis*. 1999; 3:9-14.
- Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*. 2005; 25:111-118.
- Adamis AP, Miller JW, Bernal M-T, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1994; 118:445-450.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994; 331:1480-1487.
- Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112:1476-1482.
- Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39:18-22.
- Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114:66-71.
- Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:10457-10461.
- Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120:338-346.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989; 246:1306-1309.
- Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, Otsuji T, Adamis AP, Lutty GA. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol*. 2002; 133:373-385.
- Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114:964-970.
- Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, et al. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol*. 2001; 158:1161-1172.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny V, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350:2335-2342.
- Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*. 2005; 23:1147-1157.
- Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*. 2005; 112:1035-1047.
- Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina*. 2006; 26:275-278.
- Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005; 36:336-339.
- Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina*. 2006; 26:279-284.
- Mason JO 3rd, Albert MA Jr, Vail R, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for refractory pseudophakic cystoid macular edema. *Retina*. 2006; 26:356-357.
- Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina*. 2006; 26:352-354.
- Davidorf FH, Mouser JG, Derick RJ. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (Avastin) injection. *Retina*. 2006; 26:354-356.
- Luthra S, Narayanan R, Marques LE, Chwa M, et al. Evaluation of *in vitro* effects of bevacizumab (Avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina*. 2006; 26:512-518.
- Shahar J, Avery RL, Heilweil G, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006; 26:262-269.
- Maturi RK, Bleau LA, Wilson DL. Electrophysiologic findings after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina*. 2006; 26:270-274.
- Manzano RP, Peyman GA, Khan P, et al. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006; 26:257-261.
- Bressler NM, Bressler SB, Congdon NG, et al. Potential public health impact of age-related eye disease study results: AREDS report no. 11. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121:1621-1624.
- Seigel GM. Establishment of an E1A-immortalized retinal cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. Feb 1996; 32(2):66-68.
- Seigel GM, Sun W, Wang J, Hershberger DH, Campbell LM, Salvi RJ. Neuronal gene expression and function in the growth-stimulated R28 retinal precursor cell line. *Curr Eye Res*. 2004; 28:257-269.
- Korper S, Nolte F, Rojewski MT, Thiel E, Schrezenmeier H. The K⁺ channel openers diazoxide and NS1619 induce depolarization of mitochondria and have differential effects on cell Ca²⁺ in CD34⁺ cell line KG-1a. *Exp Hematol*. 2003; 31:815-823.
- Mantymaa P, Siitonen T, Guttorm T, et al. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. *Br J Haematol*. 2000; 108:574-581.
- Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, Yoeruek E, Peters S, Henke-Fahle S. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90:1316-1321.
- Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res*. 2000; 256:58-66.