

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

MAYARA RODRIGUES BRANDÃO DE PAIVA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
IMPLANTE INTRAVÍTREO CONTENDO SIROLIMUS EM MODELO DE UVEÍTE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

BELO HORIZONTE – MG

2019

MAYARA RODRIGUES BRANDÃO DE PAIVA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
IMPLANTE INTRAVÍTREO CONTENDO SIROLIMUS EM MODELO DE UVEÍTE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

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

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Junior

Coorientadoras:

Prof. Dra. Isabela da Costa César

Dra. Sílvia Ligório Fialho (Fundação Ezequiel Dias – Funed/MG)

BELO HORIZONTE – MG

2019

P149a Paiva, Mayara Rodrigues Brandão de.
Avaliação da segurança e atividade anti-inflamatória de implante intravítreo contendo sirolimus em modelo de uveíte autoimune experimental / Mayara Rodrigues Brandão de Paiva. – 2019.
133 f. : il.

Orientador: Armando da Silva Cunha Junior.
Coorientadoras: Isabela da Costa César.
Sílvia Ligório Fialho.

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

1. Olhos – Infecções – Teses. 2. Uveíte – Teses. 3. Sirolimus – Teses. 4. Implante intravítreo – Teses. 5. Eletroretinografia – Teses. I. Cunha Junior, Armando da Silva. II. César, Isabela da Costa. III. Fialho, Sílvia Ligório. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.4



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



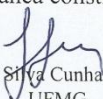
FOLHA DE APROVAÇÃO

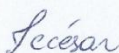
**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE DE IMPLANTE INTRAVÍTREO
CONTENDO SIROLIMUS EM MODELO DE UVEÍTE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL**

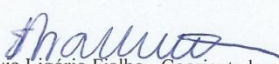
MAYARA RODRIGUES BRANDÃO DE PAIVA

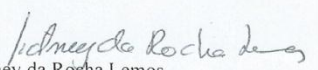
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 30 de maio de 2019, pela banca constituída pelos membros:

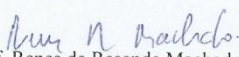

Prof. Armando da Silva Cunha Junior - Orientador
UFMG

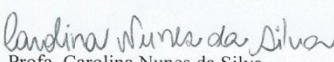

Profa. Isabela da Costa César - Coorientadora
UFMG


Dra. Sílvia Ligório Fialho - Coorientadora
FUNED


Dr. Sidney da Rocha Lemos
Instituto Lemos

Prof. Rodrigo Jorge
FMRP-USP


Prof. Renes de Resende Machado
UFMG


Profa. Carolina Nunes da Silva
UFMG

Belo Horizonte, 30 de maio de 2019.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Marta e Joaquim, pelo amor incondicional,
incentivo e apoio - devo tudo à vocês.*

*Ao Daniel, meu marido, pelo amor e companheirismo.
Eu não teria conseguido sem você ao meu lado*

*Ao meu irmão, Anderson, pela amizade,
por se meu ídolo e fonte de inspiração.*

*Aos meus sobrinhos, Artur e Beatriz,
por ser minha fonte de alegria.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior por confiar em meu trabalho e me proporcionar um aprendizado que vai muito além da vida acadêmica. Pela motivação e inspiração de ser sempre melhor e a frente do seu tempo.

À Dra. Sílvia Ligório Fialho por ser exemplo de competência, profissional, pesquisadora e mulher. Por estar sempre disposta a ajudar, motivar e instigar. Suas contribuições neste trabalho e em minha vida foram verdadeiros presentes da caminhada.

Aos meus pais que tanto amo, Marta e Joaquim, que mesmo com as dificuldades que a distância impôs, me apoiaram e me amaram sempre. Foi por sempre me ensinarem a dar o melhor de mim em tudo o que faço é que cheguei até aqui. Essa conquista é de vocês!

Ao Daniel, meu amor, por todo o amor, paciência, companheirismo, por me apoiar em todas as minhas decisões, por me lembrar que eu posso muito mais do que eu acredito e que abriu mão de muitas coisas para que eu realizasse o meu sonho.

Ao meu irmão Anderson por ser minha fonte de inspiração desde sempre, por me escutar, apoiar, entender melhor que ninguém, ser meu exemplo. À minha cunhada Carla e aos meus sobrinhos, Artur e Bia, por proporcionarem momentos familiares incríveis.

A todos os meus familiares por todo apoio e carinho, especialmente à tia Déia que sempre esteve presente me ajudando e incentivando.

As minhas amigas de infância Ju, Nath e Laura. Obrigada por me escutar nos momentos mais necessários e por compartilhar momentos incríveis.

À professora Dra. Isabella da Costa César pela ajuda e orientação na validação bioanalítica.

Ao professor Renes pela colaboração, auxílio e por disponibilizar o seu laboratório para os nossos experimentos.

Ao Dr. Gustavo de Oliveira Fulgêncio por sua ajuda na realização do estudo farmacocinético.

Ao Dr. Daniel Vitor e seus alunos pela ajuda na realização do estudo de eficácia em modelo de uveíte. Sua competência e disponibilidade são inspiração para os que trabalham com você.

À Adelaide e ao Batista por tornarem o trabalho com os animais mais fácil e por sempre estarem disponíveis para ajudar.

Ao Dário pela amizade, por ser um exemplo de competência em lidar com animais e pela grande ajuda em todos os momentos.

A todos do laboratório de farmacotécnica da FUNED pela disponibilidade e ajuda no início do meu trabalho. Em especial à Carol Guerra pela ajuda na validação bioanalítica e por ter se tornado uma verdadeira amiga nesta caminhada.

Aos grandes amigos do LTF 2031: Vinícius, Lorena, Gabi, Dani, Marcela, Nayara, Brenda, Lays, Carol, Grazi, Graci, Raquel, Cibele, Cleildo, Pedro e Ru. Obrigada pelas saídas, conselhos, risadas, alegrias, puxões de orelha, cafés astrológicos e motivação diária. Jamais esquecerei o quanto cada uma de vocês tocou a minha vida.

Aos grandes amigos de Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Ana Luíza, Liziane, Carol, Aina, Eliza, Jack, Délia, Marina, Mariana, Eduardo, Renata, Juliana pelas palavras de carinho e amizade.

A todos os professores do LTF pelo apoio, em especial a professora Elaine, exemplo de competência, dedicação e por ter se tornado uma grande amiga nesta caminhada.

RESUMO

A uveíte é uma inflamação ocular cujas complicações podem resultar em perda de visão. O tratamento dessa doença, no segmento posterior, tem sido um desafio devido à dificuldade de acesso do fármaco ao seu alvo. O Sirolimus (SRL), um potente imunossupressor, mostrou resultados promissores no tratamento de doenças oculares inflamatórias. Entretanto, como outros agentes terapêuticos, têm baixa solubilidade, e seu uso por via sistêmica está relacionado a vários efeitos adversos. Esse cenário estimula o desenvolvimento de novos sistemas de liberação para a administração do fármaco no interior da cavidade vítrea em doses terapêuticas e por um período prolongado, reduzindo os efeitos adversos e aumentando a eficácia do tratamento. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a segurança e eficácia de um implante biodegradável contendo SRL. Avaliamos o perfil de liberação *in vivo* do SRL e a toxicidade retiniana, por eletroretinografia (ERG) e histologia, a partir de implantes intravítreos de copolímero ácido láctico e ácido glicólico (PLGA) em olhos de coelhos saudáveis por 8 semanas após a administração. Além disso, avaliamos os efeitos do implante de SRL-PLGA no modelo de uveíte autoimune experimental em coelhos, incluindo avaliação clínica, exame histopatológico, alterações dos níveis de proteína, da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) em humor aquoso e humor vítreo. Os resultados mostraram que a concentração máxima de SRL (199,8 ng/mL) liberada do dispositivo ocorreu dentro de 4 semanas. Não foram observados efeitos tóxicos dos implantes ou aumento da pressão intraocular do olho dos animais saudáveis. As respostas do ERG não mostraram diferença significativa em relação ao controle durante as 8 semanas de acompanhamento. Não foi observada nenhuma diferença morfológica da retina entre os olhos de coelhos tratados com implantes PLGA ou SRL-PLGA. Os *scores* clínicos, a concentração de proteínas e a atividade das enzimas MPO e NAG, mostraram reduções significativas da inflamação nos olhos tratados após 35 dias. Exames histopatológicos mostraram inflamação e desorganização tecidual reduzida nos olhos tratados. De acordo com os resultados, os implantes desenvolvidos neste estudo foram seguros, reduziram a inflamação ocular e promoveram uma liberação prolongada de SRL no segmento posterior do olho. Portanto, os implantes intravítreos SRL-PLGA podem ser uma alternativa promissora de tratamento para a uveíte autoimune.

Palavras-Chave: Sirolimus. Sistema de liberação de fármacos. Implante intravítreo biodegradável. Eletroretinografia. Uveíte. Autoimune Experimental.

ABSTRACT

Uveitis is an ocular inflammation of the uveal tract. Complications affecting the uveal tract may result in impairment or loss of vision and has been a challenge due to the low drug bioavailability in the target tissue. Thus, there is a growing interest in finding drugs that can control inflammation. Sirolimus (SRL), a potent immunosuppressive drug, has shown promising results in the treatment of ocular diseases. Like other therapeutic agents, it has low solubility, and its intravitreal use is related to several side-effects. This scenario stimulates the development of new delivery systems that can deliver the drug inside the vitreous cavity in therapeutic doses and over a prolonged period, reducing the adverse effects and increasing the effectiveness of the treatment. In the present study, we assessed the *in vivo* release profile and the retinal toxicity, using electroretinography (ERG) and histology, of a poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) sustained-release SRL intravitreal implant in normal rabbit eyes for 8 weeks after administration. Further, we investigated the effects of SRL-PLGA implant on experimental autoimmune uveitis rabbits, including clinical evaluation, histopathological examination, alterations of protein levels determination of myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) activity were investigated either in the aqueous or vitreous humor. As a result, the maximum concentration of SRL (199.8 ng/mL) released from the device occurred within 4 weeks. No toxic effects of the implants or increase in the intraocular pressure were observed through clinical evaluation of the eye. ERG responses showed no significant difference between the eyes that received PLGA or SRL-PLGA implants at baseline and throughout the 8 weeks of follow up. No remarkable difference in retinal histopathology was detected in rabbit eyes treated with PLGA or SRL-PLGA implants. Average inflammatory scores analyses of protein concentrations, MPO and NAG activity, showed significant decreases in treated eyes after 35 days. Histopathologic examinations showed less severe inflammation and tissue disorganization in treated eyes. According to the results, the implants developed in this study were safe, reduced the eye inflammation and could overcome the difficulty of promoting a prolonged release of SRL in the posterior segment of the eye. Therefore, the intravitreal SRL-PLGA implants could be a promising alternative for the treatment to autoimmune uveitis.

Keywords: Sirolimus. Drug delivery system. Biodegradable intravitreal implant. Electroretinography. Autoimmune Experimental Uveitis.

LISTA DE FIGURAS

1. Patogênese da uveíte.....	26
2. Anatomia e barreiras oculares.....	32
3. Estrutura química do SRL.	40
4. Estrutura química (A) sirolimus e (B) tacrolimus.	52
5. Espectros MS do SRL (A) e MS/MS íon m/z 931,6 com energia de colisão de 12 V (B). 61	
6. Possível sítio de fragmentação do aduto de amônio do SRL gerando o fragmento com razão massa/carga de 864,5. Adaptado de Taylor; Johnson, 1998.....	61
7. Espectros MS do TAC (A) e MS/MS do íon m/z 821,5 com energia de colisão de 16 V (B)	62
8. Cromatogramas das amostras de vítreo branco do SRL (A) e do padrão interno (B)	63
9. Cromatogramas sobrepostos das amostras branco e matriz sintética com o LIQ (A) e com oPI (B) obtidos para a avaliação da seletividade do método bioanalítico para quantificação de SRL em humor vítreo.	64
10. Cromatogramas obtidos para as amostras branco antes (A) e após (B) injeção do LSQ no teste de efeito residual	64
11. Gráficos das curvas obtidas no estudo de efeito matriz em humor vítreo e matriz sintética	65
12. Gráficos das curvas de calibração 1, 2 e 3 obtidas no estudo de linearidade da faixa de trabalho para a validação do método bioanalítico de quantificação de SRL em humor vítreo.	66
13. Inserção dos implantes através da pars plana do olho no quadrante temporal superior utilizando trocar 25 G.....	74
14. Concentração de SRL liberada a partir dos implantes inseridos na cavidade vítrea de olhos de coelhos durante oito semanas (médias $\pm$ DP, n=6)	79
15. Fotografias mostrando o implante no vítreo imediatamente após a inserção (A), fundo de olho na terceira semana (B) e na sexta semana (C) após administração de implantes. Valores de pressão intra-ocular (PIO) após implante do dispositivo SRL-PLGA (D) ($p < 0,05$; $n = 4 \pm$ SD). As setas destacam o implante de SRL-PLGA.....	81
16. Gráficos representativos da resposta escotópica obtida do ERG após a administração de implantes de PLGA (linha cinza contínua), implantes SRL-PLGA (linha cinza tracejada) e olho de controle não tratado (linha preta) antes e após 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas da inserção dos implantes	87
17. Gráficos correspondentes à respostas fotópicas obtida do ERG após a administração de implantes de PLGA (linha cinza contínua), implantes SRL-PLGA (linha cinza tracejada) e olho de controle não tratado (linha preta) antes e após 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas da inserção dos implantes	88

18. Curvas da amplitude da onda-b versus log da intensidade luminosa dos olhos de coelhos albinos após administração de implantes de PLGA (coluna esquerda) ou SRL-PLGA (coluna direita) e os respectivos olhos controle, nos intervalos de 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas	89
19. Parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton em diferentes tempos (adaptados ao escuro). Diferença de amplitude de saturação média da onda b ($V_{m\acute{a}x}$) (A). Diferença média do log da constante de semi-saturação (k) da onda b (B) ($p < 0,05$)	90
20. Razão entre B_{amp}/A_{amp} em olhos que receberam o implante PLGA ou implante SRLPLGA e o olho controle não tratado (esquerdo) em diferentes tempos (escotópico, estímulo de 30 cd.s/m ²) ($p < 0,05$)	91
21. Fotomicrografias da retina de olhos de coelhos 56 dias após a inserção do implante intravítreo de PLGA (C e D) ou SRL-PLGA (E e F) em comparação com o olho controle não tratado (esquerdo) olho (A e B). Gráfico de barras representa a média $\pm$ desvio padrão da área em pixels retina total da retina, da camada nuclear externa (ONL) e camada nuclear interna (INL) (G). GCL - camada ganglionar.	93
22. Nódulo visível no local da injeção uma semana após a segunda pré-imunização	97
23. Fluxograma para descrever o desenho do estudo. Todos os coelhos foram pré-imunizados com duas injeções subcutâneas do antígeno BCG nos dias -14 e -7. A uveíte foi induzida 1 dia antes do tratamento por uma injeção intravítrea unilateral do antígeno BCG. As observações clínicas foram realizadas nos dias 7, 28 e 35. Os coelhos foram eutanasiados no dia 35 para análises histológicas e marcadores inflamatórios	98
24. Resposta clínica dos animais com uveíte ao tratamento com o implante de SRL-PLGA comparado aos animais não tratados. Os valores representam os <i>score</i> clínico total (A); <i>score</i> segmento anterior (B); células no segmento anterior (C) e <i>score</i> do <i>haze</i> vítreo (D) após 7, 28 e 35 dias da indução da uveíte. Barras de erro representam média $\pm$ SD. * $p < 0,05$	103
25. Fotografias representativas de animais saudáveis, não-tratados (Controle UAE) e tratados com implante de SRL-PLGA após 35 dias da indução da uveíte. Setas pretas flare e células na câmara anterior; ponta de seta preta hiperemia conjuntival; seta vermelha implante de SRL-PLGA, seta azul precipitados inflamatórios; asterisco sinéquia	104
26. Fotografias representativas de cortes histológicos de olhos saudáveis (A e B); não tratados (C e D) e tratados com implante de SRL-PLGA (E e F) após 35 dias da indução da uveíte. Seções do corpo ciliar (A, C e E) e retina (B, D e F). Podem ser observados infiltrados inflamatórios extensos nos animais não tratados e pouca inflamação ou infiltrados celulares nos olhos tratados com implante SRL-PLGA	106
27. Quantidade total de proteína presente no humor aquoso e humor vítreo após 35 dias da indução da uveíte, quantificadas pelo método Lowry. *Representa diferença estatística do controle UAE e # representa diferença do controle saudável ($p < 0,05$)	107
28. Avaliação da infiltração de neutrófilos pela atividade das enzimas NAG (A e B) e MPO (C e D) no humor aquoso (HA) e humor vítreo (HV), respectivamente, de animais controle saudáveis, controle UAE e tratados com implante de SRL-PLGA. n=5, resultados expressos em média $\pm$ erro padrão; one-way ANOVA. *Representa diferença estatística do controle UAE e # representa diferença do controle saudável ($p < 0,05$)	110

LISTA DE TABELAS

1. Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação obtidos para o SRL, na avaliação da linearidade do método bioanalítico.66
2. Dados obtidos para construção das curvas analítica de SRL nos 3 dias de análise.67
3. Valores de precisão e exatidão para SRL por UPLC–MS/MS.67
4. Concentrações médias e coeficientes de variação (CV%) calculados no estudo de estabilidade de curta duração, longa duração, ciclos de congelamento-descongelamento e pós-processamento para a validação do método bioanalítico de quantificação de SRL em humor vítreo. 69
5. Áreas médias obtidas no estudo de estabilidade do SRL e TAC em solução na temperatura de trabalho e respectivos coeficientes de variação (CV%). 69
6. Amplitude (μV) e tempos implícitos (ms) de animais adaptados ao escuro no início do estudo (controle), 24 h, 1s (1 semana), 4s (4 semanas), 6s (6semanas) e 8s (8 semanas) após a administração dos implantes PLGA (linha superior) ou SRL-PLGA (linha inferior) em comparação com o olho controle não tratado (esquerdo) ($n = 4$) ($p < 0,05$).....84
7. Amplitude (μV) e tempos implícitos (ms) de animais adaptados a luz no início do estudo (controle), 24 h, 1s (1 semana), 4s (4 semanas), 6s (6 semanas) e 8s (8 semanas) após a administração dos implantes PLGA (linha superior) ou SRL-PLGA (linha inferior) em comparação com o olho controle não tratado (esquerdo) ($n = 4$) ($p < 0,05$).....85

LISTA DE QUADROS

1. Classificação anatômica da uveíte de acordo com o SUN Working Group	23
2. Descritores da uveíte de acordo com o SUN Working Group.....	24
3. Sistemas de liberação implantáveis aprovados pelo FDA ou em estudo para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho.....	35
4. Formas farmacêuticas de veiculação de SRL em oftamologia	47
5. Método cromatográfico e espectrométrico para a quantificação de SRL em humor vítreo	53
6. Composição da solução da salina balanceada	55
7. Constituição da solução de Davidson utilizada para fixação histológica	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC- células apresentadoras de antígeno (do inglês - *antigen-presenting cells*)

ARPE- 19 - Linhagem do epitélio pigmentar da retina

ARVO - Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia

ASC - área sob a curva (AUC, *Area Under the Curve*)

BHA - Barreira hematoaquosa

BHR - Barreira hemoretiniana

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

C_{max} - concentração máxima de fármaco

CMVR - Retinite por citomegalovírus (do inglês- cytomegalovirus retinitis)

CNTF - fator neurotrófico ciliar

CQ - controle de qualidade

CQA - controle de qualidade alto

CQB - controle de qualidade baixo

CQD - controle de qualidade de diluição

CQM - controle de qualidade médio

CV - coeficiente de variação

DME - edema macular diabético

DMRI - Degeneração macular ligada à idade (do inglês- Age-related macular degeneration)

DPR - Desvio padrão relativo

ECC - ciclos de congelamento e descongelamento

ECD - estabilidade de curta duração

ECT - Tecnologia de células encapsuladas (do inglês - *encapsulated cell technology*)

ELD - estabilidade de longa duração

EMA - Agência Europeia de Medicamentos (do inglês - *European Medicines Agency*)

EPP - estabilidade pós-processamento

EPR - Erro padrão relativo

EPR- Epitélio pigmentado da retina

ERG - eletrorretinografia

EVA - poli (etileno-co-acetato) de vinila

FasL - peptídeo intestinal vasoativo e ligante Fas

FDA - Administração de Comida e medicamentos (do inglês - *Food and Drug Administration*)

FK506 - tacrolimus

FKBP-12- imunofilina FKBP-12 (do inglês- *FK506 Binding Protein-12*)

HIF-1 - fator induzido por hipoxia

IFN γ - interferon gama

IFN alfa – Interferon alfa

IL – Interleucina

ISCEV - *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*

IVT- injeção intravítreo

LIQ - limite inferior de quantificação

LSQ - limite superior de quantificação

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (do inglês - *major histocompatibility complex*)

MPO - enzima mieloperoxidase

mTOR- cinase dos mamíferos alvo da rapamicina

MUST - Tratamento de uveíte multicêntrico com esteróide (do inglês - *Multicenter Uveitis Steroid Treatment*)

NAG - enzima lisossomal N-acetil-b-D-glicosaminidase

NIU- uveíte não-infecciosa

OP - potencial oscilatório

PEG – Polietilenoglicol

PET - Poli (Tereftalato de Etileno)

PGA - Polímero poli-glicólico

PI - padrão interno

PIO - Pressão intra-ocular

PLA - Polímero poli (lático)

PLGA - Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico)

PMMA: nn(metil metacrilato

PMN - células polimorfonucleares

PVA - álcool polivinílico

RPM – Rotação por minuto

SRL - Sirolimus

TAC - tacrolimus

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta (do inglês, Beta Transforming growth factor)

Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1

Th17 – Linfócito T auxiliar tipo 17

Th2 – Linfócito T auxiliar tipo 2

T_{max} - tempo para se alcançar a concentração máxima de fármaco

TNF – do inglês, Tumoral Necrosis Factor

TR - tempo de retenção

T_{reg} - células T reguladoras

UPLC- MS/MS - Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial

VEGF - Fator de crescimento endotelial (do inglês- vascular endothelial growth factor)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Uveíte	22
2.1.1 Aspectos fisiopatológicos	24
2.2 O tratamento da uveíte posterior	27
2.2.1 Tratamento farmacológico da uveíte	27
2.2.2 Barreiras para administração de fármacos no segmento posterior	29
2.2.3 Vias de administração de fármacos para tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho	32
2.3 Sistemas intravítreos de liberação de fármacos	34
2.4 Sirolimus	39
2.4.1 Propriedades físico-químicas	40
2.4.2 Mecanismo de ação na uveíte	41
2.4.3 Utilização do SRL na oftalmologia	42
3. OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo Geral	49
3.2 Objetivos Específicos	49
 CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE SRL EM HUMOR VÍTREO E PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS IMPLANTES DE SRL-PLGA	 50
1 MATERIAL E MÉTODOS	51
1.1 Materiais	51
1.2 Equipamentos	51
1.3 Métodos	51
1.3.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de sirolimus em humor vítreo por UPLC-MS/MS	51
1.3.2 Preparo das amostras	53
1.3.3 Preparo das soluções padrão	54
1.3.4 Seletividade	54
1.3.5 Efeito residual	54
1.3.6 Efeito Matriz	55
1.3.7 Linearidade da faixa de trabalho	55

1.3.8 Precisão, exatidão e recuperação.....	56
1.3.9 Estabilidade	57
2 RESULTADO E DISCUSSÃO	60
2.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de sirolimus em humor vítreo por UPLC-MS/MS	60
2.1.1 Seletividade	62
2.1.2 Efeito residual	63
2.1.3 Efeito Matriz	65
2.1.4 Linearidade da faixa de trabalho	65
2.1.5 Precisão, exatidão e recuperação	66
2.1.6 Estabilidade	68
3 CONCLUSÃO.....	71
 CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO, TOXICIDADE E BIOCOMPATIBILIDADE DOS IMPLANTES DE SRL-PLGA.....	
1 MATERIAL E MÉTODOS	73
1.1 Animais	73
1.2 Preparo dos implantes	73
1.3 Inserção dos implantes na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos	73
1.4 Perfil de Liberação	74
1.5 Avaliação Clínica	74
1.6 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma de campo total (ERG)	75
1.7 Avaliação histológica	76
1.8 Análise estatística.....	77
2 RESULTADO E DISCUSSÃO	78
2.1 Perfil de Liberação	78
2.2 Avaliação Clínica	80
2.3 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma de campo total (ERG)	82
2.4 Avaliação histológica	92
3 CONCLUSÃO	94
 CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTI-INFLAMATÓRIA DOS IMPLANTES DE SRL-PLGA EM MODELO DE UVEÍTE EXPERIMENTAL	
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	96
1.1 Materiais.....	96

1.2	Equipamentos.....	96
1.3	Animais	96
1.4	Indução da Uveíte	96
1.5	Tratamento Experimental da Uveíte	97
1.6	Avaliação clínica da uveíte	98
1.7	Avaliação histopatológica	98
1.8	Quantificação de proteínas no humor aquoso e humor vítreo.....	99
1.9	Análise de infiltrados celulares por quantificação das Enzimas MPO e NAG	99
1.10	Análise Estatística	100
2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
2.1	Avaliação clínica da uveíte	101
2.2	Avaliação histopatológica	105
2.3	Quantificação de proteínas no humor aquoso e humor vítreo.....	107
2.4	Análise de infiltrados celulares por quantificação das enzimas MPO e NAG.....	108
3	CONCLUSÃO	112
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
	PERSPECTIVAS.....	114
	PRODUÇÃO CIENTÍFICA OBTIDA DURANTE O DOUTORADO	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
	ANEXOS	131

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

As doenças oculares inflamatórias estão entre as mais prevalentes causas de cegueira em todo o mundo. Dentre elas, destaca-se a uveíte, que compreende um grupo de doenças caracterizadas por inflamação do trato uveal, o qual é composto pela íris, corpo ciliar e coroide. Estas estruturas desempenham papéis essenciais para o bom funcionamento do sistema visual. A uveíte é responsável por complicações oculares como catarata, glaucoma e descolamento de retina que podem resultar em cegueira (GRITZ *et al.*, 2017; JONES *et al.*, 2018). O tratamento da uveíte não-infecciosa (NIU) consiste principalmente no uso de corticosteroides, imunossupressores, anti-inflamatórios e agentes biológicos administrados por via sistêmica ou intravítrea. Contudo, o tratamento por estas vias pode causar efeitos indesejados, concentrações abaixo da dose terapêutica e incômodo ao paciente (KNICKELBEIN *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas capazes de melhorar a biodisponibilidade intraocular de fármacos tem sido um campo de pesquisa de grande interesse. Neste contexto, destaca-se o uso de implantes intraoculares preparados com materiais biocompatíveis e biodegradáveis, que possibilitam uma liberação gradual, em concentrações desejáveis diretamente no sítio-alvo (MANDAL *et al.*, 2018; NEUMANN; BAREQUET, 2019).

O Sirolimus (SRL) é uma lactona macrocíclica inicialmente descoberta devido a sua atividade antifúngica contra *Streptomyces higroscopicus* e mais tarde também utilizado em stents coronários para o tratamento de restenose, para evitar rejeição em pacientes submetidos a transplantes renais. Devido a sua atividade antiproliferativa e antiangiogênica despertou o interesse para o tratamento de tumores sólidos e finalmente para tratar doenças oculares (TERADA *et al.*, 1993; NAPOLI; TAYLOR, 2001; GUBA, 2002; NGUYEN *et al.*, 2018a).

A administração oral de SRL demonstrou inibição completa da uveíte autoimune em estudos pré-clínicos e também foi eficaz em pacientes com NIU severa (ROBERGE *et al.*, 1993; SHANMUGANATHAN, 2005). No entanto, seu uso oral requer monitorização laboratorial e clínica para toxicidade sistêmica. Recentemente, uma formulação para injeção intravítrea de SRL foi avaliada e demonstrou fornecer o fármaco de forma eficiente à retina/coroide, com mínima exposição sistêmica. Assim, SRL intravítreo demonstrou ter potencial na redução da inflamação ocular em indivíduos com NIU aguda ou crônica. No entanto, para a manutenção da dose terapêutica eficaz são necessárias injeções bimestrais o que pode levar a ocorrência de

efeitos adversos indesejáveis, como descolamento de retina, elevação da pressão intraocular e catarata (MUDUMBA *et al.*, 2012; IBRAHIM *et al.*, 2015; NGUYEN; MERRILL; *et al.*, 2016).

Em 2015, PAIVA (2015) desenvolveu e caracterizou implantes a partir do copolímero ácido láctico e ácido glicólico (PLGA 75:25) para liberação intravítrea de SRL. Os estudos de caracterização realizados com os implantes obtidos apresentaram resultados satisfatórios, dentre eles a liberação *in vitro* do fármaco por pelo menos 6 semanas. Para o tratamento da uveíte, especialmente a uveíte crônica, o fármaco deve permanecer por semanas ou meses na cavidade vítrea, sendo, portanto, essencial a avaliação do perfil de liberação do SRL liberado do implante de PLGA em olhos de coelhos. Além disso, quando se desenvolve novas formas farmacêuticas de liberação de fármacos, é necessário avaliar a toxicidade desses sistemas por meio de técnicas *in vitro* e *in vivo*.

Visando dar continuidade aos resultados promissores já obtidos no desenvolvimento do implante de SRL, o presente trabalho tem como objetivo determinar o perfil de liberação *in vivo* dos sistemas, avaliar a biocompatibilidade destes no segmento posterior do olho de coelhos saudáveis por meio de exames clínicos, eletroretinográficos, histopatológicos, além de verificar sua eficácia em modelo de uveíte autoimune experimental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uveíte

A uveíte é uma doença inflamatória que afeta não apenas o trato uveal (íris, corpo ciliar e coroide), mas também a retina e seus vasos, o nervo óptico e o vítreo (PRETE *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2019). Embora a incidência anual de uveíte não seja elevada e varie de acordo com a população em estudo, cerca de 25-121 pessoas a cada 100.000 habitantes, a doença afeta profundamente a qualidade de vida do paciente, além do importante impacto socioeconômico (ACHARYA *et al.*, 2013; THORNE *et al.*, 2016; RIM *et al.*, 2017; GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

O comprometimento da visão é uma complicação comum na uveíte em todo o mundo, sendo maior nos países em desenvolvimento. Em um estudo conduzido no Reino Unido 3,5-4% dos pacientes diagnosticados com uveíte foram classificados como deficientes visuais ou com perda significativa da visão. Na Etiópia a prevalência de baixa visão e cegueira foi de 10,3 e 7,3%, respectivamente (CHERINET *et al.*, 2018; JONES *et al.*, 2018). No Brasil, o estudo conduzido por Silva e colaboradores (2013) mostrou que a uveíte foi a segunda causa mais comum de deficiência visual, com prevalência de 15,7%, superada apenas por doenças retinianas não infecciosas. A maioria dos estudos não considera a uveíte como causa de perda visual, mas complicações funcionais e anatômicas secundárias a uveíte são descritas como causas de deficiência visual. Essa pode ser decorrente de danos às estruturas do trato uveal, ou devido a efeitos secundários nos tecidos vizinhos como, por exemplo, a formação acelerada de catarata, glaucoma e edema macular (SILVA *et al.*, 2013; BARRY *et al.*, 2014; TSIROUKI *et al.*, 2018).

Em contraste com as doenças oculares relacionados à idade, a uveíte pode ter um forte impacto socioeconômico, pois frequentemente afeta pacientes mais jovens, entre 20 e 60 anos o que representam 70-90% dos casos, indivíduos na fase profissional ativa (GRITZ *et al.*, 2017; GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Em um estudo recente realizado no Brasil a maioria dos pacientes diagnosticados com uveíte tinha entre 41 e 64 anos (41,79%), sendo a média de 39,8 ± 17,8 anos e a maioria do sexo feminino (56,8%) (FERNANDEZ *et al.*, 2016).

Existem atualmente vários esquemas para classificação da uveíte. Eles podem estar relacionados ao local onde ocorre a inflamação, ao curso clínico, à etiologia e à histopatologia. *The Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) working group*

desenvolveu em 2005 a classificação que é atualmente mais utilizada, sendo a uveíte classificada quanto a sua anatomia em: uveíte anterior, uveíte intermediária, uveíte posterior e panuveíte (**Quadro 1**). A uveíte anterior é a que apresenta maior prevalência (42%–54%), seguida pela panuveíte, uveíte posterior e intermediária (MÉRIDA *et al.*, 2015a; FOSTER *et al.*, 2016; KRISHNA *et al.*, 2017). O grupo SUN também enfatiza a importância do início (súbito ou insidioso), da duração (limitado ou persistente) e do curso (aguda, recorrente ou crônica) da uveíte, como descrito no **Quadro 2**. Em um estudo recente conduzido no Brasil a uveíte anterior foi observada em 29,25% dos casos, a uveíte intermediária em 7,22%, a uveíte posterior em 40,08%, panuveíte em 15,97%; e esclerite em 7,50%. De 40,74% eram uveítes crônicas e 35,99% uveíte aguda (FERNANDEZ *et al.*, 2016).

Quadro 1 - Classificação anatômica da uveíte de acordo com o SUN Working Group

Classificação anatômica da uveíte de acordo com o <i>SUN Working Group</i>		
Tipo	Sítio primário da inflamação	Inclui
Anterior	Câmara anterior	Irite Iridociclite Ciclite anterior
Intermediária	Vítreo	Pars planite Hialite Cilcrite posterior
Posterior	Retina e coroide	Coroidite focal Coroidite multifocal Coroidite difusa Corioretinite Retinite Neuroretinite
Panuveíte	Câmara anterior, vítreo e retina ou coroide	

(Adaptado de *Standardization of Uveitis Nomenclature Working Group*, 2005)

A uveíte também pode ser classificada de acordo com o curso clínico como infecciosa, quando um agente infeccioso é reconhecido (por exemplo: *Herpes virus*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*) ou não-infecciosa, quando se acredita que a origem seja autoimune ou imuno mediada (PRETE *et al.*, 2016). A distribuição etiológica da uveíte varia em todo o mundo. Em geral, a uveíte anterior é frequentemente idiopática, enquanto que a uveíte posterior tem

prevalência infecciosa. Geralmente, a uveíte posterior de origem infecciosa apresenta um pior prognóstico do que a não infecciosa (FOSTER *et al.*, 2016; SÈVE *et al.*, 2017).

Quadro 2 - Descritores da uveíte de acordo com o SUN Working Group

SUN Working Group descritores da uveíte		
Categoria	Descritor	Definição
Início	Súbito	Início rápido dos sintomas
	Insidioso	Início gradual dos sintomas
Duração	Limitado	≤ 3 meses de duração
	Persistente	> 3 meses de duração
Curso	Agudo	Episódio único com início súbito e duração limitada
	Recorrente	Episódios repetidos separados por períodos inativos sem tratamento ≥ 3 meses de duração
	Crônico	Uveíte persistente com recaída dentro de 3 meses após a interrupção do tratamento

(Adaptado de *Standardization of Uveitis Nomenclature Working Group*, 2005)

A uveíte pode ainda ser classificada de acordo com as principais características patológicas em uveíte granulomatosa, caracterizada por visão turva, dor leve e leve sensibilidade à luz; uveíte não granulomatosa, com início agudo, dor e sensibilidade intensa à luz e uma melhor taxa de recuperação do que a uveíte granulomatosa (MÉRIDA *et al.*, 2015a; KRISHNA *et al.*, 2017). Uma abordagem efetiva para o tratamento da uveíte requer uma compreensão dos aspectos fisiopatológicos envolvidos na doença.

2.1.1 Aspectos fisiopatológicos

O olho, assim como o cérebro, a placenta e os testículos apresentam o que é conhecido como “privilegio imunológico”, ou seja, possuem um mecanismo fisiológico que fornece proteção contra patógenos, preservando o delicado eixo visual do potencial de uma inflamação imunogênica. Para isso, o olho conta com mecanismos anatômicos, como uma barreira física (barreira hematorretiniana- BHR) e ausência de drenagem linfática, e também mecanismos moleculares, como a secreção de fatores imunossupressores por células oculares, como TGF- β 2, hormônio estimulante de α -melanócitos, peptídeo intestinal vasoativo e ligante Fas (FasL) ou a baixa expressão de moléculas MHC de classe I e II em células apresentadoras de

antígenos. Estes mecanismos também ajudam a inativar a resposta imune de células de epitélio pigmentado com características semelhantes aos macrófagos, que são capazes de secretar citocinas anti-inflamatórias e têm demonstrado inibir a capacidade proliferativa de células T em culturas (DURRANI *et al.*, 2004; MÉRIDA *et al.*, 2015b).

No entanto, a influência do ambiente ocular local é crítica na regulação da imunidade das células T, e trabalhos recentes sugerem que o estado imunológico privilegiado do olho é contornado na uveíte, levando à acumulação de células inflamatórias e subsequentes danos aos tecidos oculares (DURRANI *et al.*, 2004; CASTIBLANCO; FOSTER, 2014; AIRODY *et al.*, 2016). Apesar dos aspectos fisiopatológicos da uveíte ainda não estarem bem elucidados, acredita-se que um desequilíbrio imunológico induzido por antígenos de retina, que podem ser tanto endógenos (distúrbios autoimunes) quanto exógenos (vírus ou bactérias), iniciem um processo inflamatório desencadeado pela ativação de células linfocitárias (células T), as quais são capazes de reconhecer estes antígenos que são apresentados pelas APC (*antigen-presenting cells*), promovendo a ativação das células T (CASPI, 2010; SÈVE *et al.*, 2017).

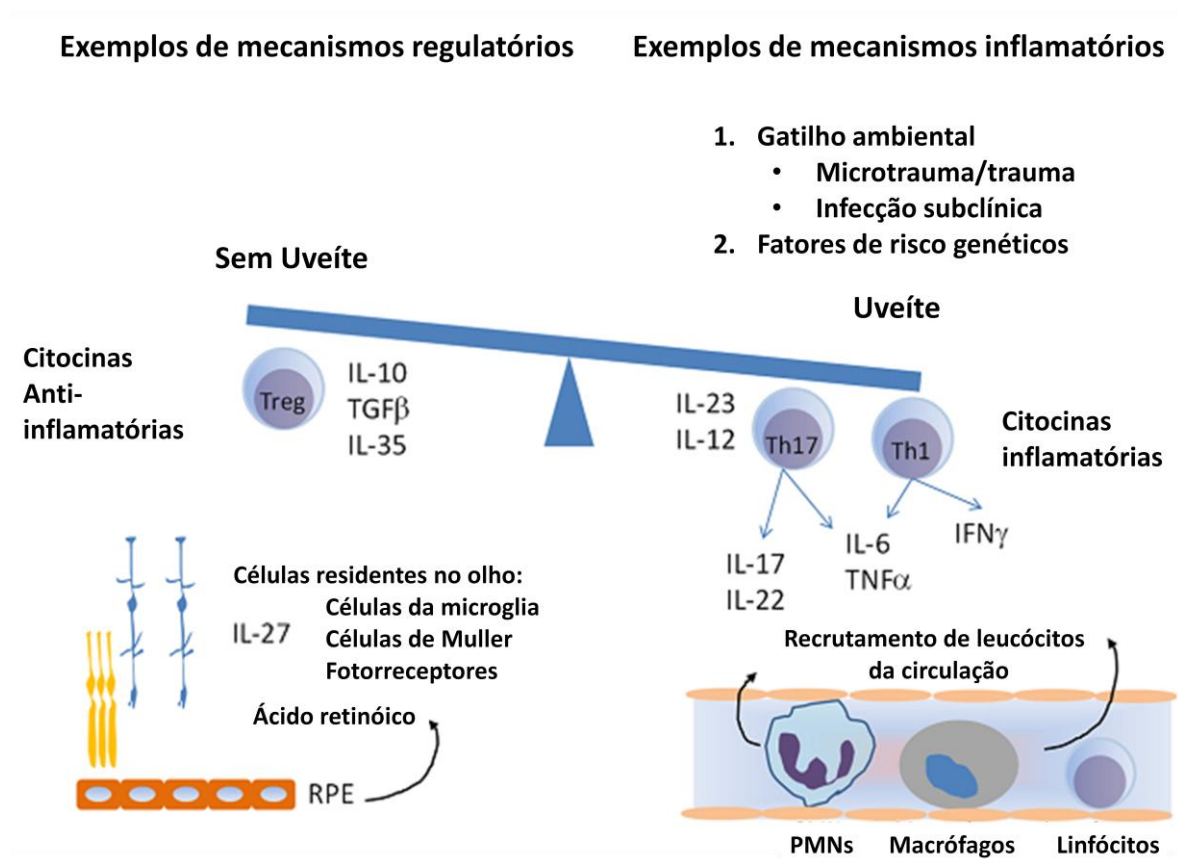
Em seguida, as células T impulsionam o processo inflamatório através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-2, IL-12, TNF- α , INF- γ) e quimiocinas, ativando a vascularização da retina e promovendo recrutamento de leucócitos da circulação. São estes leucócitos recrutados, os neutrófilos, monócitos e células T policlonais inespecíficas, que fornecem mediadores finais para o dano tecidual, sendo este um passo fundamental para o desenvolvimento da doença, uma vez que a intensa migração de células leva ao aparecimento de danos estruturais na retina (MÉRIDA *et al.*, 2015b; PRETE *et al.*, 2016).

A inflamação é iniciada, principalmente, por macrófagos e células dendríticas residentes no tecido ocular, as quais ao realizarem a captura de antígenos promovem a ativação de linfócitos T, que podem diferenciar-se em Treg (T reguladores), Th1, Th2, Th17 (LEE *et al.*, 2014; MÉRIDA *et al.*, 2015b; FORRESTER *et al.*, 2018)

As células Th1 e Th17 participam na uveíte inflamatória e autoimune. No entanto, enquanto as células Th1 são cruciais para o desenvolvimento da uveíte, as células Th17 desempenham um papel relevante na fase tardia/crônica da doença. Além disso, a migração de Th1 e Th17 para o olho resulta em lesão da BHR, o que permite o recrutamento de diferentes leucócitos da circulação (VALLOCHI *et al.*, 2007; MÉRIDA *et al.*, 2015b; KRISHNA *et al.*, 2017).

Embora a uveíte seja uma doença heterogênea com influências poligênicas e ambientais, acredita-se que a maioria das formas de uveíte imune-mediadas seja devido a um desequilíbrio entre mecanismos reguladores que inibem o sistema imunológico e mecanismos inflamatórios, que evoluíram para livrar o organismo de agentes infecciosos, mas podem resultar em doença crônica se forem ativados fora do contexto da infecção imediata (**Figura 1**). Dessa forma, há um aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-12, TNF- α e INF- γ) em relação às anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), fatores quimiotáticos, ativação do sistema complemento, células apresentadoras de antígeno, linfócitos T, linfócitos B e células endoteliais (LIN *et al.*, 2014; PEPPL *et al.*, 2015).

Figura 1 - Patogênese da uveíte



FONTE: LIN *et al.*, 2014

Assim sendo, o tratamento adequado para a uveíte deve visar a supressão da inflamação preservando o sistema imune, bem como a prevenção de complicações oculares, redução do desconforto do paciente e se possível, a remoção da causa primária (SMET *et al.*, 2011; HASSAN *et al.*, 2019).

2.2 O tratamento da uveíte posterior

2.2.1 Tratamento farmacológico da uveíte

A escolha da estratégia para o tratamento da uveíte deve inicialmente ser fundamentada na etiologia (infecciosa ou não infecciosa), que irá definir o tipo de medicamento necessário (antimicrobianos ou anti-inflamatórios/imunossupressores). Em seguida, a extensão da uveíte e a presença de inflamação associada (localização anatômica; unilateral ou bilateral e a presença de doença sistêmica) devem ser avaliadas. Esses fatores são considerações importantes para a escolha da via de administração (tópica, local ou sistêmica). A gravidade da doença irá definir a necessidade de tratamento adicional. Em quarto lugar, as complicações decorrentes da doença em si ou dos tratamentos administrados também devem ser considerados (BARRY *et al.*, 2014; CASTIBLANCO; FOSTER, 2014; AIRODY *et al.*, 2016).

Os corticosteroides são os fármacos de primeira escolha no tratamento da doença, principalmente para o controle da inflamação aguda na uveíte não infecciosa, devido ao seu rápido início de ação e potencial efeito anti-inflamatório (KNICKELBEIN *et al.*, 2016). Sua propriedade anti-inflamatória é mediada por receptores de glicocorticóides citosólicos, que aumentam a expressão de proteínas anti-inflamatórias. Esses receptores, membros da família de receptores nucleares de fatores de transcrição, foram encontrados no corpo ciliar, tecido córneo-escleral e íris (CASTIBLANCO; FOSTER, 2014; MÉRIDA *et al.*, 2015a).

O tratamento da uveíte não infecciosa (uveíte posterior, intermediária e panuveíte) consiste no uso de corticosteroides (por exemplo, dexametasona, triancinolona, prednisolona e betametasona), os quais agem por múltiplos mecanismos incluindo a transcrição da proteína inibitória fosfolipase-A2. Essa proteína controla a síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos. Assim, ocorre inibição da vasodilatação, redução da permeabilidade vascular, diminuição da migração de leucócitos e redução dos níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esses também suprimem a proliferação de células T, a produção de citocinas e diminuem os mecanismos de ativação, como por exemplo, a produção de IFN- γ (SIMONINI *et al.*, 2010; SMET *et al.*, 2011; TALAT *et al.*, 2015; KNICKELBEIN *et al.*, 2016).

Devido ao amplo número de genes e proteínas sobre os quais atuam os corticosteroides, existe uma grande variedade de efeitos adversos que acompanham o uso desses fármacos, muitos

deles potencialmente sérios. A utilização sistêmica a longo prazo pode desencadear efeitos adversos que incluem síndrome de *Cushing*, osteoporose, hipertensão, dislipidemia, insuficiência adrenal, resistência a insulina e outros efeitos adversos mais raros, como necrose avascular das articulações e retardo do crescimento em crianças. Efeitos oculares adversos indesejáveis também são descritos na literatura frequentemente quando esses fármacos são administrados pelas vias periocular e intravítrea almejando alcançar níveis adequados de fármaco no segmento posterior do olho, como desenvolvimento ou progressão da catarata e elevação da pressão intraocular (PIO) potencialmente levando ao glaucoma (SIMONINI *et al.*, 2010; TALAT *et al.*, 2015; KNICKELBEIN *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2019).

Embora os corticosteroides permaneçam como um dos pilares do tratamento da uveíte, devido à crescente preocupação decorrente dos efeitos adversos associados ao seu uso prolongado, alternativas terapêuticas, como os agentes imunossupressores, foram introduzidos no tratamento de inflamações oculares no final dos anos 1960 (KNICKELBEIN *et al.*, 2016; ZHAO; ZHANG, 2017). Os agentes imunossupressores são classificados em: agentes alquilantes, incluindo ciclofosfamida e clorambucil; antimetabólitos, como azatioprina, metotrexato e micofenolato de mofetil; e inibidores de células T, como ciclosporina, tacrolimus, sirolimus e everolimus (BARRY *et al.*, 2014; FOSTER *et al.*, 2016; ZHAO; ZHANG, 2017).

Em virtude do baixo índice terapêutico dos agentes imunossupressores, inicialmente esses tiveram seu uso limitado no tratamento de pacientes resistentes ou intolerantes a corticosteroides ou em casos em que havia sério comprometimento da visão. Com os avanços no conhecimento sobre a toxicidade e mecanismo de ação desses fármacos, além do avanço nas experiências clínicas, esses fármacos tornaram-se uma alternativa terapêutica para uma série de doenças inflamatórias oculares. Quando administrados no local, em dose terapêutica, por médicos devidamente capacitados e com rigorosa monitorização observou-se um menor índice de efeitos adversos quando comparado ao uso crônico de corticosteroides sistêmicos (SMET *et al.*, 2011; ZHAO; ZHANG, 2017).

Atualmente o uso de agentes imunossupressores é recomendado em dois principais casos (1) quando corticosteroides são insuficientes para controlar a doença, (2) quando a imunossupressão de longo prazo é necessária para alcançar o controle da doença, mas o índice de toxicidade decorrente do uso de corticosteroides é alto na dose necessária (maior do que 10

mg /dia), o que é frequente no tratamento de uveíte (SMET *et al.*, 2011; FOSTER *et al.*, 2016; ZHAO; ZHANG, 2017).

Mesmo que os avanços descritos acima tenham modificado o tratamento de doenças oculares com agentes imunossupressores, ainda existem importantes desafios no uso desses fármacos, principalmente para os imunossupressores citotóxicos. O tratamento com esses fármacos não é eficaz, mesmo usando doses terapêuticas máximas, para algumas doenças como coriorretinopatia de *Birdshot*, uveíte na artrite idiopática juvenil e coroidite serpiginosa. Além disso, o uso dos imunossupressores poupadores de corticosteroides mais utilizados clinicamente tem demonstrado limitada eficácia no tratamento de doenças oculares (KRISHNA *et al.*, 2017; HASSAN *et al.*, 2019).

Quando os corticosteroides e os imunossupressores não são bem tolerados ou não-efetivos, utilizam-se os agentes biológicos. Esses atuam como supressores seletivos de respostas imunes por direcionar moléculas específicas em mecanismos efetores autoimunes e inflamatórios. Os agentes biológicos podem ser anticorpos recombinantes, antagonistas de citocinas específicas ou receptores de superfície celular, e citocinas recombinantes (tais como IFNs). Os primeiros fármacos foram descritos em 1994 e desde então uma série de agentes biológicos tem sido investigados para doenças oculares inflamatórias, com a grande maioria dos trabalhos publicados relacionados ao tratamento de uveíte. Entre os agentes biológicos temos: antagonistas TNF (adalimumabe, infliximabe, golimumabe, etanercepte); anti CD20 (rituximabe); antagonista do receptor de IL-6 (tocilizumabe); antagonista do receptor de IL-1 (anakinra); INF-alfa; antagonistas do fator de crescimento endotelial (VEGF) (bevacizumabe, ranibizumabe, em casos de edema vascular) (GALLEGO-PINAZO *et al.*, 2013; PRIYANKA, 2017).

Uma das maiores preocupações relacionadas ao tratamento da uveíte é a ocorrência de graves efeitos adversos decorrentes da administração sistêmica de fármacos. Desse modo, a administração local de corticosteroides, imunossupressores, bem como agentes biológicos representa uma alternativa para o tratamento (ZHAO; ZHANG, 2017).

2.2.2 Barreiras para administração de fármacos no segmento posterior

O olho é um órgão com um elaborado mecanismo de proteção que incluem várias barreiras anatômicas (conjuntiva, córnea, esclera, barreiras hematoaquosa e hematorretiniana) e fisiológicas (fluxo sanguíneo na coroide, efluxo, lacrimação induzida, drenagem

nasolacrimal) (AGRAHARI *et al.*, 2016). Essas barreiras o protegem de materiais exógenos, no entanto, impedem também a permeação de agentes terapêuticos para o segmento posterior (KANG-MIELER *et al.*, 2014; KAUR; KAKKAR, 2014).

O filme lacrimal consiste em uma das barreiras pré-córneas que reduz de maneira efetiva a concentração de fármacos administrados pela via tópica devido à diluição que ocorre na drenagem nasolacrimal (aproximadamente 1 $\mu\text{L}/\text{min}$), acelerando o *clearance*, além da ligação do fármaco a proteínas. Além disso, o volume decorrente da instilação (20-50 μL) é bastante superior ao volume de líquido que pode ser acomodado pelo olho (7-10 μL), dessa forma o excesso de volume será expulso do olho ou sairá pelo ducto nasolacrimal (KUNO; FUJII, 2011; DELPLACE *et al.*, 2015).

A córnea consiste em uma barreira mecânica que impede o transporte de substâncias exógenas para o interior do olho. É uma estrutura transparente, composta de colágeno, com aproximadamente 500 μm de espessura, composta por três camadas: epitélio, estroma e endotélio, que fornece a maior parte do poder de refração do olho e é a principal barreira para a absorção tópica de fármacos (KUNO; FUJII, 2011; KIM *et al.*, 2014). Cada camada possui diferentes polaridades, o que limita a velocidade de permeação do fármaco. A natureza lipofílica do epitélio da córnea, composta por junções serradas entre as células limitam a permeação paracelular de fármacos a partir do filme lacrimal. Devido à estrutura altamente hidrofílica do estroma da córnea, essa atua como uma barreira à permeação de moléculas de fármacos lipofílicos. O endotélio da córnea é a monocamada mais interna de células, essas possuem forma hexagonal, e atua como uma barreira de separação entre o estroma e o humor aquoso. As junções endoteliais são permeáveis e facilitam a passagem de macromoléculas entre o humor aquoso e o estroma. Devido à limitada difusão de fármacos através da córnea e a dificuldade de se manter no filme lacrimal, a maioria dos fármacos instilados por via tópica apresentam baixa biodisponibilidade, entre 1-7% (KUNO; FUJII, 2011; SUBRIZI *et al.*, 2019).

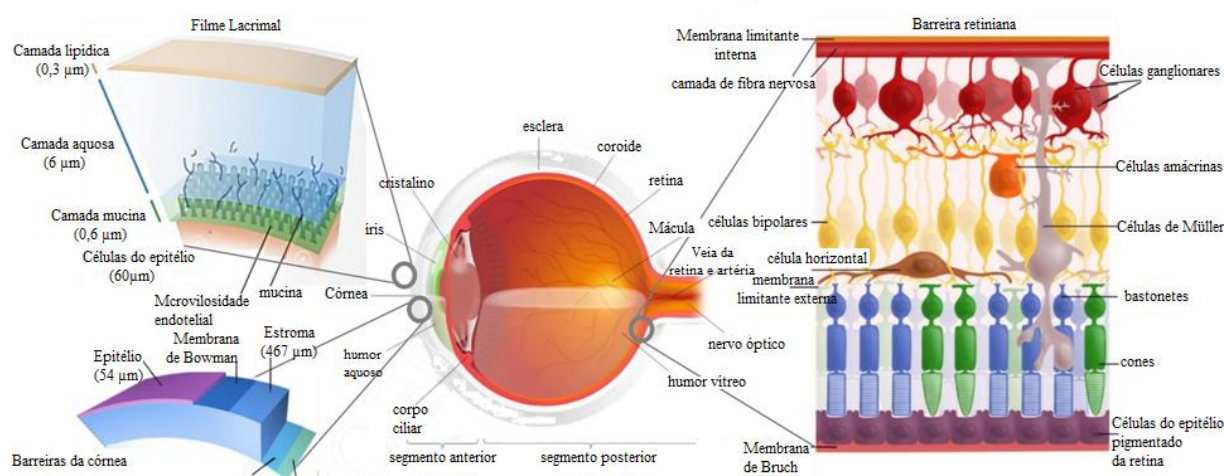
A conjuntiva é uma membrana fina e transparente, que é superficial à esclera e está envolvida na formação e manutenção do filme lacrimal. Assim como o epitélio da córnea, o epitélio da conjuntiva também apresenta junções serradas que impedem a fácil penetração de moléculas, mas diferente do que acontece na córnea, essas junções são mais largas permitindo a passagem de moléculas maiores. Além disso, a conjuntiva e a episclera tem uma grande quantidade de capilares e vasos linfáticos que removem moléculas ou partículas que estão na

superfície escleral do olho, fazendo com que moléculas que são absorvidas através da conjuntiva sejam muitas vezes transportadas para a circulação sistêmica (DELPLACE *et al.*, 2015; BARAR *et al.*, 2016).

A esclera consiste principalmente em fibras de colágeno e proteoglicanos incorporados numa matriz extracelular e também apresenta uma barreira à difusão de macromoléculas. Além da massa molar, a hidrofobicidade e a carga dos fármacos alteram a permeabilidade pela esclera, fármacos hidrofílicos se difundem mais facilmente que os lipofílicos e compostos carregados positivamente podem se ligar à matriz de proteoglicanos carregada negativamente, o que reduz sua permeabilidade (KUNO; FUJII, 2011; KIM *et al.*, 2014).

Para a administração de medicamentos no segmento posterior do olho a BHR atua como uma barreira significativa à absorção de fármacos na retina e no vítreo quando administrado por via sistêmica (KAUR; KAKKAR, 2014). A porção interior regula a entrada de moléculas na retina, já a porção exterior se situa entre os fotorreceptores e os coriocalpares (PEYNSHAERT *et al.*, 2018). Após a administração sistêmica, as moléculas do fármaco podem entrar facilmente na coroide, devido a sua alta vascularização em comparação com a retina. Os coriocalpares são fenestrados resultando em um rápido equilíbrio das moléculas de fármaco presentes na corrente sanguínea com o espaço extravascular da coroide. No entanto, a camada externa da BHR restringe a entrada adicional de fármacos na retina, pois esse tecido é constituído por uma monocamada de células hexagonais repletas de melanócitos, localizadas entre a retina sensorial e a coroide. As junções serradas do EPR restringem eficientemente a permeação intercelular na retina sensorial (KUNO; FUJII, 2011).

Para o tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho, como as uveítes, o principal objetivo é obter o agente farmacológico, na concentração terapêutica, por um método que não cause danos aos tecidos saudáveis. Portanto, devido às barreiras anatômicas e fisiológicas descritas acima, sistemas de liberação de fármacos para o segmento posterior com mínimos efeitos sistêmicos e indesejáveis são um grande desafio (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010; HIMAWAN *et al.*, 2019).

Figura 2- Anatomia e barreiras oculares.

Adaptado de DELPLACE *et al.*, 2015; MANDAL *et al.*, 2018

2.2.3 Vias de administração de fármacos para tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho

As vias de administração utilizadas para a administração de fármacos para o segmento posterior do olho são a tópica, sistêmica, intravítrea, periocular (subconjuntival, subtenoniana e retrobulbar) e supracoroidal.

A administração tópica é um método relativamente fácil e seguro de administração de fármaco. No entanto, a administração por essa via é considerada ineficaz para o tratamento de doenças que atingem o segmento posterior do olho, uma vez que menos de 5% da dose aplicada topicamente é biodisponível e uma fração ainda menor (0,001%) deverá atingir o segmento posterior, não alcançando concentração terapêutica (KAUR; KAKKAR, 2014; RATAY *et al.*, 2017). Tal fato pode ser atribuído aos seguintes fatores: volume limitado de administração (30 µL); rápido *clearance*; metabolismo por enzimas lacrimais; baixa absorção pela circulação sistêmica via conjuntiva, coróide, trato uveal e retina interna; barreiras do segmento anterior (córnea, conjuntiva e esclera); fluxo de saída de humor aquoso; longo caminho difusional e natureza acelular do vítreo, o que pode ter um impacto negativo na farmacocinética e na distribuição de fármacos aplicados topicamente (KAUR; KAKKAR, 2014; KIM *et al.*, 2014).

Além disso, a alta frequência de administração necessária para as soluções e suspensões, a exposição sistêmica devido à absorção pela conjuntiva e o sistema de drenagem nasolacrimal são fatores que levam à baixa adesão do paciente. No caso de pomadas e géis, apesar do relativo aumento na biodisponibilidade, os pacientes podem apresentar dosagem incorreta e

visão turva devido à diferença do índice de refração entre a lágrima e a natureza não aquosa da base da pomada, fator que também leva à baixa adesão do paciente (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de abordagens alternativas, como sistemas nanoparticulados, lentes de contato e plugues de ponto, para aumentar a biodisponibilidade, reduzir a frequência de administração do fármaco, melhorar a adesão do paciente e a eficácia global do tratamento tem sido foco de pesquisas recentes (HIMAWAN *et al.*, 2019; NEUMANN; BAREQUET, 2019). Mas, de modo geral, a administração de fármacos pela via tópica não alcança o segmento posterior do olho (retina, vítreo, coroide) em concentrações terapêuticas, para esse fim, a administração sistêmica, periocular ou injeção intravítrea são as abordagens frequentemente empregadas (KUNO; FUJII, 2011; SUBRIZI *et al.*, 2019).

A disponibilidade de fármacos no segmento posterior através da administração sistêmica, como comprimido, cápsula ou injeção intravenosa é limitada devido à presença da BHR, que apresenta permeabilidade seletiva para moléculas altamente lipofílicas. Fármacos como cloranfenicol e minociclina, que apresentam alta lipofilicidade, conseguem atravessar a BHR, já fármacos como aminoglicosídeos (amicacina) e β -lactâmicos (cefazolina), de natureza hidrofílica, que foram propostos para o tratamento de endoftalmite, não alcançaram o vítreo em concentração terapêutica por via sistêmica (BODDU; NESAMONY, 2013). Para que fármacos administrados por essa via sejam de fato eficazes são necessárias administrações frequentes em altas doses, devido à baixa biodisponibilidade (1-2%), o que resulta em efeitos sistêmicos indesejados. Essa não é uma abordagem viável para fármacos potentes com baixo índice terapêutico (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010; KAUR; KAKKAR, 2014).

A via de administração periocular inclui a administração de fármacos ao redor do olho no espaço subconjuntival, peribulbar, subtenoniana e injeção retrobulbar. Essa via utiliza a via trans-escleral para administrar fármacos junto à coroide, uma significativa barreira à permeação de macromoléculas. Contudo, as perdas de fármacos através do fluxo conjuntival, episcleral e do fluxo linfático são fatores limitantes para a administração de pequenas moléculas por esta via (KIM *et al.*, 2014; AGRAHARI *et al.*, 2016). A via periocular apresenta melhor biodisponibilidade (0,01-0,1%), quando comparada à via de administração tópica ($\leq 0,001\%$), mas é menos eficiente em relação à administração intravítrea. Para o tratamento de doenças crônicas que atingem o segmento posterior podem ser realizadas repetidas administrações sob anestesia sem interferência direta na visão. Em comparação com

a administração intravítrea, pode ser administrado um volume de solução cerca de dez vezes maior (entre 500 - 5000 μL para via pericocular e 50-100 μL pela via intravítrea) (KAUR; KAKKAR, 2014).

Uma das vias de administração de fármacos mais eficientes para o segmento posterior é a intravítrea devido à sua proximidade com a retina, coróide e EPR. Essa envolve a administração direta de um fármaco em solução ou suspensão no humor vítreo, via *pars plana* (KAUR; KAKKAR, 2014; AGRAHARI *et al.*, 2016; DEL AMO *et al.*, 2017). Apesar de invasiva, essa via apresenta maior biodisponibilidade e contorna várias barreiras oculares. Desde o início da década de 1940, a injeção de intravítrea tem sido usada rotineiramente para o fornecimento de vários medicamentos, incluindo antibióticos para o tratamento de infecções intraoculares e esteróides para o tratamento da inflamação ocular e DMRI. A administração por esta via foi realizada a fim de superar a falta de eficácia dos antibióticos no tratamento de infecções oculares bacterianas após a administração intravenosa (SHATZ *et al.*, 2019).

No entanto, para o controle efetivo de doenças crônicas são necessárias repetidas administrações que invariavelmente estão associadas com sérios riscos, como hemorragia, desconforto persistente, descolamento de retina (em 0,05% das administrações), degeneração de fotorreceptores, aumento da PIO, catarata e endoftalmite (em 0,2% das administrações) (KAUR; KAKKAR, 2014; AGRAHARI *et al.*, 2016). Além disso, a adesão do paciente é menor com tais regimes devido aos procedimentos dolorosos e invasivos que requerem hospitalização e um médico especialmente treinado para administração, adicionando ao custo do procedimento, além do alto custo do medicamento (SUBRIZI *et al.*, 2019).

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade de fármacos no segmento posterior pelo desenvolvimento de sistemas de liberação que permitam um maior intervalo de tempo entre as administrações, maior conforto ao paciente e minimizar os efeitos indesejáveis. Entre esses sistemas estão lipossomas, micelas, nanopartículas, hidrogéis, dendrímeros, *inserts* e implantes poliméricos (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010; NEUMANN; BAREQUET, 2019).

2.3 Sistemas intravítreos de liberação de fármacos

Para atender a crescente incidência de doenças crônicas que afetam o segmento posterior do olho têm sido desenvolvidos vários sistemas de liberação controlada/modificada de fármacos. Esses sistemas variam na sua composição e duração de ação do fármaco a fim de se adequar à

via de administração, às propriedades físico-químicas do ativo, à redução de efeitos adversos e ao aumento da adesão do paciente. Além disso, descobertas em terapia gênica, pesquisa com células-tronco e terapia com proteínas evidenciaram a necessidade de novos sistemas de liberação capazes de aumentar a estabilidade e biodisponibilidade dessas substâncias (FISCHER *et al.*, 2011; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011; JOSEPH *et al.*, 2016)

Existem vários sistemas de liberação de fármaco, os quais incluem: micro e nanocarreadores (lipídicos, poliméricos e metálicos), suspensões, lipossomas, micelas, dendrímeros; tecnologia de células encapsuladas (ECT, do inglês *encapsulated cell technology*); vetores virais; iontoforese; implantes biodegradáveis e não biodegradáveis (HIMAWAN *et al.*, 2019; NEUMANN; BAREQUET, 2019). O **quadro 3** apresenta sistemas implantáveis aprovados pelo FDA ou em estudo para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho.

Quadro 3 - Sistemas de liberação implantáveis aprovados pelo FDA ou em estudo para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho.

Implante	Status atual	Doença	Fármaco e excipientes	Tempo de liberação
Vitrasert®	Aprovado	CMRV	Ganciclovir com EVA/PVA	8 meses
Retisert®	Aprovado	Uveíte posterior crônica não-infecciosa	Fluocinolona acetona (0,59 mg) com silicone/PVA	2,5 anos
Ozurdex (Posurdex®)	Aprovado	DME, CRVO, uveíte	Dexametasona (0,7 mg) com PLGA	6 meses
Iluvien (Medidur®)	Aprovado Fase clínica 2 Fase clínica 3	DME DMRI Uveíte posterior	Fluocinolona acetona (0,19 mg) com poliimida/PVA	3 anos
I-vation™	Fase clínica 2	DMRI	Triancinolona acetona (0,925 mg) com PVA e EVA	2 anos
Brimonidina implante	Fase clínica 2	DMRI seca e retinite pigmentar	Brimonidina (0,4 mg) com PLGA	6 meses
Verisome® (IBI-20089)	Fase clínica 1 Fase clínica 2	DMRI CMRV	Triancinolona acetona (6 ou 13,8 mg) e benzilbenzoato com lucentis (0,5 mg)	1 ano
Renexus® (NT-501)	Fase clínica 1	Retinite pigmentar	CNTF com PET e células ARPE-19	18 meses
Ciclosporina A	Fase clínica 1	Uveíte	Ciclosporina A	2-3 anos
AR-13503 Implante	Fase clínica 1 Fase clínica 2	DMRI DME	Poliéster amida	Não disponível

CMRV: retinite por citomegalovírus; CNTF: fator neurotrófico ciliar; CRVO: oclusão da veia central da retina; DME: edema macular diabético; DMRI: edema macular relacionado à idade; EVA: poli(etileno-co-acetato) de vinila; PET, Poli (Tereftalato de Etileno); PMMA: nn(metil metacrilato); PVA: álcool polivinílico.

FONTE: www.clinicaltrials.gov

O uso de implantes para o tratamento da doença do segmento posterior tem despertado grande interesse, visto que estes permitem a liberação sustentada do fármaco, eliminando a necessidade de múltiplas injeções. Além disso, aproveitando o privilégio imunológico intraocular, muitos implantes foram utilizados com sucesso sem provocar reações inflamatórias significativas (FIALHO *et al.*, 2003; AWWAD *et al.*, 2017).

Dependendo do polímero utilizado para o preparo do implante estes podem ser classificados como biodegradáveis ou não biodegradáveis, podendo ser de dois tipos: matriciais (ou monolítico) e reservatórios (FIALHO *et al.*, 2003; BOURGES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2010). Os implantes não biodegradáveis proporcionam um controle mais preciso da liberação do fármaco e períodos mais longos do que os implantes biodegradáveis, porém necessitam de remoção cirúrgica, o que está associada a risco.

Em um sistema matricial o fármaco pode estar disperso homogeneamente na matriz polimérica ou adsorvido em sua superfície. A liberação de fármaco é governada um *burst* inicial seguido por difusão do fármaco pela matriz polimérica, proporcionando a sua liberação controlada ou sustentada. Por outro lado, os sistemas do tipo reservatório liberam o fármaco através de membranas permeáveis ou por um pequeno orifício numa membrana impermeável. Ambos os sistemas proporcionam liberação de fármaco de ordem zero em concentrações eficazes durante longos períodos de tempo (FIALHO *et al.*, 2003; YASIN *et al.*, 2014). A taxa de liberação do fármaco é determinada por diferentes fatores, tais como a área de liberação, a espessura da membrana polimérica, a forma do implante, bem como a solubilidade do fármaco (BOURGES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2010).

Entre os polímeros não biodegradáveis mais comumente utilizados estão o álcool polivinílico (PVA), etileno-co-acetato de vinila (EVA) e silicone. Já para os implantes biodegradáveis os polímeros mais frequentemente utilizados são policaprolactona, ácido poli-lático (PLA), o ácido poli-glicólico (PGA) e, especialmente o copolímero de ácido lático e glicólico, o ácido poli lático-co-glicólico (PLGA). A velocidade de erosão e a degradação destes polímeros podem ser moduladas para permitir a cinética intraocular de liberação do fármaco desejada (ELJARRAT-BINSTOCK *et al.*, 2010).

Pesquisas mostraram que o PLGA proporciona boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica, baixa toxicidade, excelente biocompatibilidade e uma cinética previsível de biodegradação, a qual pode ser controlada pelas propriedades físico-químicas do

polímero tais como a massa molecular, a hidrofiliabilidade e a proporção dos ácidos láctico/glicólico (ZHANG *et al.*, 2009; KUNO; FUJII, 2011; KANG-MIELER *et al.*, 2014).

De modo a evitar a necessidade de administração intraocular frequente de corticoides, foram desenvolvidos e aprovados pelo FDA sistemas de liberação sustentada, tais como Retisert® (Bausch & Lomb, Bridgewater, NJ, EUA) e Ozurdex® (Allergan, Irvine, CA, EUA) para o tratamento de uveíte. Esses dispositivos estão disponíveis sob diversas formas e podem ser administrados por injeção intravítrea ou por fixação cirúrgica à esclera através de uma incisão na *pars plana* (CASTIBLANCO; FOSTER, 2014; AIRODY *et al.*, 2016). A principal indicação para utilização desses sistemas é em casos de uveíte não infecciosa grave ou recorrente, unilateral ou bilateral, ou em pacientes intolerantes aos corticosteroides sistêmicos ou em casos onde estes não foram efetivos.

O Retisert® foi aprovado em 2005 nos EUA para o tratamento de uveíte crônica e não infecciosa que acomete o segmento posterior do olho. Este sistema de liberação consiste em um implante polimérico não biodegradável para a veiculação de fluocinolona acetona é implantado por meio de um procedimento cirúrgico através de uma incisão na *pars plana* (CALLANAN *et al.*, 2008; AIRODY *et al.*, 2016; JAFFE *et al.*, 2018). Apesar de o implante ter demonstrado redução da recorrência de uveíte, melhora da acuidade visual, redução da necessidade de terapia adjuvante e efeitos sistêmicos mínimos, muitos pacientes desenvolveram catarata e glaucoma após a inserção do implante, necessitando de cirurgia (JAFFE *et al.*, 2018).

Devido aos efeitos indesejáveis decorrentes da administração do Retisert®, o mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu o Iluvien® que apresenta uma menor concentração de corticosteroide e foi aprovado para o tratamento de edema macular diabético, mas está sendo submetido a ensaios clínicos para o tratamento de uveíte posterior. Além da menor quantidade de fármaco (0,19 mg), o que diminui a ocorrência de efeitos secundários, esse dispositivo apresenta maior tempo de liberação do fármaco (36 meses) (KANE *et al.*, 2008; AWWAD *et al.*, 2017).

O implante intravítreo de liberação prolongada de dexametasona (700 µg), Ozurdex® é indicado para o tratamento de pacientes com uveíte crônica não infecciosa intermediária ou posterior (HALLER *et al.*, 2011; BOYER *et al.*, 2014). O implante dura cerca de três meses e foi aprovado originalmente em 2009 para o tratamento de edema macular diabético.

Em um estudo comparativo dos implantes Ozurdex[®] e Retisert[®] que avaliou a incidência de eventos adversos ou complicações oculares, nenhum olho no grupo que recebeu o implante Ozurdex[®] necessitou de terapia adicional para glaucoma, cirurgia ou laser, comparado a 44% dos olhos no grupo de Retisert[®]. Com relação à catarata, no grupo Ozurdex[®], 50% dos olhos fáticos no início apresentaram progressão de catarata e cirurgia subsequente, em comparação com 100% dos olhos de Retisert[®]. Olhos com o implante Retisert[®] apresentaram 4,7 vezes mais risco de progressão da catarata (ARCINUE *et al.*, 2013).

Em 2006, Fialho e colaboradores desenvolveram implantes biodegradáveis de PLGA e dexametasona (1000 µg) que foram inseridos na cavidade vítrea de olhos de coelhos por meio de uma incisão na *pars plana*. O fármaco foi liberado a uma taxa de 0,15 a 4,00 µg/mL, dentro da faixa terapêutica necessária para suprimir uma inflamação ocular, por até 8 semanas. Os sistemas desenvolvidos não demonstraram toxicidade nos exames eletroretinográfico e histológico, comprovando sua biocompatibilidade. Esses dispositivos estão em estudo de fase clínica modificado I/II visando o tratamento de edema macular associado à oclusão da veia central ou do ramo da veia central da retina (CUNHA *et al.*, 2018).

Almeida e colaboradores (2015) desenvolveram implantes biodegradáveis de PLGA contendo 350 µg de ciclosporina visando o tratamento da uveíte. O implante desenvolvido apresentou liberação de 256-589 ng/mL durante as oito semanas do estudo em coelhos albinos, não foi observada qualquer alteração histológica na retina, no entanto foi observada uma redução significativa na amplitude da onda b no estudo eletroretinográfico, o que pode estar relacionado à toxicidade do fármaco.

No estudo conduzido por Fernandes-Cunha e colaboradores (2015) o perfil farmacocinético de um implante de PLGA contendo clindamicina visando uma alternativa para o tratamento de uveíte causada por toxoplasmose ocular foi comparado à injeção intravítrea do fármaco em olhos de coelhos saudáveis. Os implantes disponibilizaram o fármaco por até seis semanas enquanto a injeção permaneceu no vítreo por apenas duas semanas com valores significativamente maiores de área sob a curva (39,2 e 716,7 ng/mL, respectivamente). A fim de avaliar a potencial toxicidade ocular dos implantes desenvolvidos, foram realizados ensaios de toxicidade *in vivo* em olhos de ratos usando tomografia de coerência óptica, bem como análises *ex vivo* por histologia, imunofluorescência e PCR em tempo real. Este estudo,

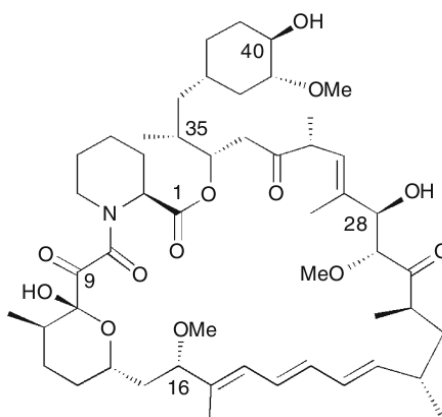
combinado com o estudo anterior, destaca a clindamicina como um tratamento alternativo para a uveíte causada por toxoplasmose ocular (FERNANDES-CUNHA *et al.*, 2017).

Com o intuito de melhorar a biodisponibilidade intravítrea do fluconazol para o tratamento local da endoftalmite fúngica induzida por espécies de *Candida*, Silva e colaboradores (2016) desenvolveram um sistema alternativo constituído de PLGA e fluconazol. Os implantes demonstraram biocompatibilidade adequada em olhos de coelhos, o fármaco foi liberado dos implantes durante 6 semanas, enquanto a suspensão injetada no olho foi detectada por 120 minutos.

Solano e colaboradores (2018) produziram um implante intraocular biodegradável contendo etopósídeo, um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia, para o tratamento de retinoblastoma, com baixa biodisponibilidade oral. Os dispositivos liberaram aproximadamente 63% do fármaco em 42 dias em olhos de coelhos saudáveis, o exame oftálmico e o ensaio em membrana corioalantóica de ovos de galinha (HET-CAM) não revelaram evidências de efeitos tóxicos dos implantes.

2.4 Sirolimus

O Sirolimus (SRL) (**Figura 3**), também conhecido como rapamicina, é uma lactona macrocíclica que inicialmente foi isolado nos anos 70 como um antibiótico produto do *Streptomyces hygroscopicus* na ilha de Páscoa também conhecida como “Rapa Nui” (SEHGAL, 2003). Devido à sua semelhança estrutural com a ciclosporina, o SRL foi originalmente utilizado com potente agente antifúngico especialmente contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. No entanto, logo foi demonstrada sua potente ação como agente imunossupressor e antiproliferativo. Desta forma, em 1999 foi aprovado pelo FDA o seu uso como agente imunossupressor em transplante renal. O SRL foi comercializado inicialmente pela Wyeth (atualmente Pfizer) com o nome comercial de Rapamune[®] (SEHGAL, 2003; FORREST *et al.*, 2006; ABRAHAM *et al.*, 2010).

Figura 3 – Estrutura química do SRL.

Fonte: FDA

Mais recentemente, devido ao seu efeito citostático, O SRL também tem sido reconhecido como possível agente quimioterápico (FORREST *et al.*, 2006; ONYESOM *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015). O mecanismo antitumoral do SRL ocorre, através da ligação do FKBP12 e inibição do mTOR (receptor alvo da rapamicina em mamíferos), o qual é um regulador central do crescimento e proliferação celular. (BJORNSTI; HOUGHTON, 2004; FORREST *et al.*, 2006). A mTOR é uma serina/treonina cinase (289 kDA) pertencente à família PIK3/AKT, a qual regula a progressão e os *check points* do ciclo celular que regem as respostas celulares a danos e recombinação de DNA. (MITA *et al.*, 2003; ONYESOM *et al.*, 2013). Além disso, o SRL bloqueia a ativação de NF- κ B, que pode sensibilizar células tumorais resistentes a fármacos frequentemente utilizados no tratamento quimioterápico (ROMANO *et al.*, 2004; FORREST *et al.*, 2006).

Outro mecanismo pelo qual o SRL apresenta potencial atividade antitumoral está associado com sua propriedade antiangiogênica, já que o fármaco atua diminuindo a produção do VEGF e inibindo a resposta endotelial celular à estimulação com VEGF (GUBA, 2002; DEJNEKA *et al.*, 2004). Com base nisso, o SRL tem sido estudado para o tratamento de múltiplas doenças oculares dos segmentos anterior e posterior do olho causadoras de neovascularização (ELSAID *et al.*, 2014).

2.4.1 Propriedades físico-químicas

O SRL é um sólido cristalino branco com ponto de fusão de 183° a 185 °C. É praticamente insolúvel em água (2,6 µg/ml), altamente lipossolúvel ($P_{o/a}$ = 5,77) e solúvel na maioria dos

solventes orgânicos. O fármaco elevada massa molar (914,2 g/mol), não contém grupos funcionais que são ionizáveis no intervalo de pH entre 1 e 10 (SIMAMORA *et al.*, 2001; SEHGAL, 2003; BUECH *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2011).

2.4.2 Mecanismo de ação na uveíte

O SRL atua ao formar um complexo com a imunofilina FK 12 (proteína FKBP) no citosol formando um complexo SRL-FKBP-12. Esse complexo se liga e inibe a cinase dos mamíferos, alvo da rapamicina (mTOR) impedindo a diferenciação de células Th1 e Th17, o que o torna eficaz para doenças autoimunes. A atividade anti-inflamatória deste fármaco se deve a inibição da progressão do ciclo da fase G1 para a fase S nas células T bloqueando a via de transdução de sinal mediada pela interleucina-2 (IL-2) (TERADA *et al.*, 1993; CHOLKAR *et al.*, 2014). O SRL apresenta atividade anti-angiogênica, antifibrótica, antifúngica e antimigratória (WONG *et al.*, 1998; GUBA, 2002; DEJNEKA *et al.*, 2004; STAHL *et al.*, 2008; ROUF *et al.*, 2009).

Guba e colaboradores (2002) elucidaram a capacidade deste fármaco de inibir a produção de VEGF e alterar a resposta das células endoteliais à estimulação do VEGF. Pela inibição do mTOR, o SRL inibe a expressão e sinalização do VEGF e regula o fator induzido por hipoxia-1 (HIF-1). Além disso, ele inibe a hiperpermeabilidade microvascular induzida pelo VEGF. O fármaco também inibe a atividade da proteína quinase C, que é ativada por hiperglicemia; a proteína quinase C leva a alterações na microvasculatura e promove a angiogênese (DUGEL *et al.*, 2012). Embora muitos mediadores pró-inflamatórios estejam envolvidos na patogênese da uveíte, tem sido proposto que o VEGF desempenha um papel crítico na inflamação, além do seu papel fundamental na angiogênese, o VEGF leva à fenestração entre as células endoteliais vasculares, bem como aumenta a permeabilidade vascular. Na uveíte autoimune, com componente inflamatório e patologia relacionada a eventos imunomediados, existem estudos prévios que relataram aumento nos níveis de VEGF no humor aquoso (AH) e no sangue (AYYILDIZ *et al.*, 2015).

O SRL inibe as citocinas IL-4, IL-12, IL-7, IL-15, bem como a função e amplificação das células B (SEHGAL, 1998). Também já foi comprovado seu efeito anti-inflamatório pela redução da expressão protéica de genes associados à inflamação, incluindo IL-8, polipeptídeo II ativador de monócitos endoteliais e ciclooxigenase -1 e -2. Devido à multiplicidade de vias

afetadas pelo SRL, esse apresenta grande potencial em numerosos processos de doenças oculares (DUGEL *et al.*, 2012).

Apesar do potencial terapêutico do SRL em estudos pré-clínicos, seu uso clínico é um grande desafio devido à ausência de uma formulação adequada. A biodisponibilidade oral a partir de comprimidos é baixa (15%) sendo possível sua utilização somente para doenças cujo tratamento exige uma pequena dosagem. Essa baixa biodisponibilidade pode ser atribuída à sensibilidade do fármaco ao ácido gástrico, à parcial absorção intestinal e ao metabolismo hepático de primeira passagem (MACDONALD *et al.*, 2000; JOZWIAK *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2011). Soma-se a isso a sua baixa solubilidade em água, o que compromete sua administração via intravenosa. Além disso, estudos farmacocinéticos revelaram a forte ligação à eritrócitos ($K_d = 20$) o que pode resultar em uma diminuição da ação de uma dose única do fármaco, por diminuir a concentração máxima atingida no receptor, alterando, assim sua resposta clínica (YATSCOFF *et al.*, 1995; FORREST *et al.*, 2006). Com o objetivo de melhorar a solubilidade e biodisponibilidade do SRL, várias formulações têm sido pesquisadas, entre elas complexos de inclusão, lipossomas, nanocristais, hidrogel, micelas, dispersões sólidas, nanopartículas e dispositivos poliméricos (BUECH *et al.*, 2007; CHOLKAR *et al.*, 2014; HOU *et al.*, 2015; LANCE *et al.*, 2015; NIETO *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018).

2.4.3 Utilização do SRL na oftalmologia

O uso do SRL como alternativa para diversas doenças oculares é proposto devido às suas múltiplas atividades terapêuticas já elucidadas (ELSAID *et al.*, 2014). A prevenção da rejeição de enxerto após o transplante de córnea, doenças inflamatórias crônicas, tais como uveíte são indicações importantes para o uso de imunossupressores (BUECH *et al.*, 2007; SEN *et al.*, 2012).

A atividade anti-inflamatória do fármaco foi investigada inicialmente em dois estudos usando modelo animal de uveíte autoimune para avaliar o efeito sinérgico de baixas doses de SRL e inibidores da calcineurina, tacrolimus e ciclosporina administrados por via intraperitoneal. Nos dois estudos a administração combinada de fármacos reduziu de modo mais significativo os sinais clínicos da uveíte quando comparado a administração individual de cada fármaco, demonstrando relação sinérgica entre eles, o que permite o uso de doses menores de cada um

para alcançar efeito terapêutico no tratamento da uveíte autoimune, diminuindo assim a toxicidade relacionada ao seu uso (MARTIN *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 1997).

A administração sistêmica de SRL não é capaz de alcançar o segmento posterior do olho em concentração terapêutica em virtude das barreiras hematóculares (SHI *et al.*, 2006) e pode causar efeitos adversos como trombocitopenia, astenia, epistaxe, cefaléia e leucopenia em pacientes após transplante de órgãos (PERRY; NEUBERGER, 2005; IBRAHIM *et al.*, 2015). Em coelhos, a administração sistêmica alcançou concentrações no humor aquoso superiores a 15 ng/mL e produziu hiperlipidemia e trombocitopenia (SHI *et al.*, 2006).

A administração sistêmica de SRL em pacientes com uveíte refratária, cuja doença não foi controlada com pelo menos dois ou mais imunossupressores esteroides, com dose inicial de 6 mg/dia seguida de 4 mg/dia se mostrou eficaz para a maioria dos pacientes. No entanto, a ocorrência de efeitos adversos como sintomas gastrointestinais, cutâneos e aumento discreto do colesterol foram observados quando os níveis de fármaco no sangue eram maiores do que 25 ng/mL (SHANMUGANATHAN, 2005).

Phillips e Wroblewski (2011) investigaram o uso oral de menores doses de SRL (1-4 mg como adjuvante na terapia com corticosteroides no tratamento de uveíte refratária. No entanto, o tratamento apresentou melhora pouco significativa. Embora a resposta inicial tenha sido boa em alguns pacientes, houve um número significativo de efeitos adversos que fizeram com que o tratamento tenha sido interrompido.

Em estudo piloto, que avaliou a segurança e eficácia da administração subconjuntival de SRL (1320 µg), o fármaco mostrou promissora eficácia no tratamento para a inflamação ativa em pacientes com uveíte anterior crônica. No entanto, efeitos adversos como: irritação ocular, vermelhidão, quemose e sensação de corpo estranho foi relatada por 4 dos 5 pacientes avaliados neste estudo (SEN *et al.*, 2012).

Em razão das complicações associadas à administração sistêmica do fármaco, a administração local apresenta-se como a melhor alternativa para o tratamento de doenças intraoculares. Inicialmente foram realizados estudos pré-clínicos para avaliar a farmacocinética e a toxicidade da administração intravítrea. No estudo conduzido por Douglas e colaboradores (2008) foi avaliada a toxicidade ocular e distribuição de SRL após injeção intravítrea (5 e 10 mg) e subconjuntival (10 mg) em cavalos saudáveis, por até 21 dias após a administração. No entanto, as concentrações intravítreas após administração estiveram abaixo da faixa

terapêutica (15 ng/mL) (MACDONALD *et al.*, 2000). Neste estudo também foi demonstrado que o SRL não se solubiliza homogeneamente no humor vítreo, formando um depósito que libera o fármaco de modo gradual.

No estudo conduzido por Mudumba e colaboradores (2012), uma formulação contendo SRL (DE-109) foi injetada no humor vítreo de coelhos (220 µg), em dose única ou múltipla, e em pacientes (352 µg) com edema macular associado à retinopatia diabética. Quando a formulação foi injetada no humor vítreo, tanto nos animais quanto nos pacientes, o SRL se agregou na forma de um depósito devido à sua hidrofobicidade. Nos estudos clínicos, os níveis mais elevados de fármaco no sangue foram após dois dias da administração (<2 ng/mL) e o tempo de meia-vida foi de 8–9 dias.

A segurança do SRL administrado localmente em pacientes com uveíte foi investigada no estudo clínico de fase I realizado pela SAVE - Sirolimus como abordagem terapêutica para uveíte (*do inglês Sirolimus as a therapeutic Approach for uVEitis*) (ClinicalTrials.gov identifier, NCT00908466), 30 pacientes com uveíte não infecciosa (uveíte posterior, n = 18; uveíte intermediária, n = 9; panuveíte, n = 3) foram divididos de modo aleatório em dois grupos: o grupo 1 (n=15) que recebeu 352 µg SRL intravítreo e o grupo 2 (n=15) que recebeu 1320 µg SRL subconjuntival. Apesar da eficácia na redução da inflamação ocular em indivíduos com uveíte não infecciosa ativa ou quiescente, alguns pacientes dos dois grupos tratados apresentaram efeitos adversos sistêmicos e oculares de leve a moderado, como moscas volantes (*do inglês: vitreal floaters*), hiperemia conjuntival e quemose, sendo mais prevalentes no grupo que recebeu injeção subconjuntival. Além disso, para a manutenção da dose terapêutica eficaz foram necessárias injeções a cada dois meses (NGUYEN *et al.*, 2013; IBRAHIM *et al.*, 2015; NGUYEN; SADIQ; *et al.*, 2016).

Com base nos resultados de estudos pré-clínicos e de fase 1, um estudo multicêntrico de fase 2, SAVE 2 (ClinicalTrials.gov identifier, NCT01280669), foi realizado para determinar o melhor esquema posológico: 440 µg administrado mensalmente ou 880 µg administrado por injeção intravítrea a cada dois meses. Vinte e quatro pacientes com diagnóstico de uveíte não infecciosa (uveíte posterior, n = 14; uveíte intermediária, n = 6; panuveíte, n = 4) participaram do estudo. Como resultados os dois grupos apresentaram diminuição do *haze* vítreo, sendo a menor dose mais eficaz na redução do edema macular relacionado a uveíte do que a dose mais alta. Como observado no estudo SAVE 1, efeitos adversos locais e sistêmicos foram

classificados como leve a moderado e mais prevalentes na maior dose, 36,4% no grupo que recebeu 440 µg e 46,2% no grupo que recebeu 880 µg. (NGUYEN; SADIQ; *et al.*, 2016).

O estudo clínico de fase III “*Sirolimus study Assessing double-masKed Uveitis tReAtment (SAKURA)*” (ClinicalTrials.gov identifier, NCT01358266) foi conduzido para avaliar a eficácia e segurança de três doses de SRL (44, 440 e 880 µg) administrado por injeção intravítrea a cada dois meses em 592 pacientes (347 pacientes no SAKURA 1 e 245 pacientes no SAKURA 2) com uveíte intermediária não infecciosa ativa, uveíte posterior e panuveíte. Nenhum dos pacientes apresentou efeitos adversos sistêmicos graves, o que era esperado visto que uma das maiores vantagens do tratamento intraocular é a administração local do fármaco com mínima exposição sistêmica. Em contraste, os efeitos adversos oculares foram frequentes, 44 a 50% dos olhos avaliados, estes incluíram efeitos adversos oculares graves como endoftalmite dose dependente (3,4% do grupo de 880 µg, 0,9% no grupo de 440 µg e nenhum no grupo de 44 µg), desenvolvimento de catarata e aumento na pressão intraocular (16 - 20% dos pacientes em cada um dos três grupos). (NGUYEN; MERRILL; *et al.*, 2016; PLEYER; THURAU, 2016; NGUYEN *et al.*, 2018b).

A alta proporção de efeitos adversos inflamatórios é claramente uma das principais causas de preocupação quanto ao uso de SRL intravítreo, principalmente quando administrado em pacientes com uveíte ativa. Além disso, sugere-se que os cristais do fármaco precipitem durante o procedimento de injeção e gerem uma resposta inflamatória inespecífica (NGUYEN; MERRILL; *et al.*, 2016; PLEYER; THURAU, 2016; NGUYEN *et al.*, 2018b).

Embora o SRL seja um potente fármaco imunossupressor, seu uso para doenças que afetam o segmento posterior do olho é limitado devido à sua baixa solubilidade em água e curta meia vida no vítreo (DOUGLAS *et al.*, 2008; NIETO *et al.*, 2015). Dessa forma, um sistema de liberação eficaz é crucial para maximizar os seus efeitos terapêuticos.

Alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de prolongar o tempo de permanência do SRL no segmento posterior do olho. Em um estudo recente, micropartículas de sílica porosa foram desenvolvidas para a administração intravítrea de SRL. Os sistemas obtidos demonstraram boa compatibilidade ocular, mas a cinética de liberação foi limitada a aproximadamente 1 mês (HOU *et al.*, 2015; NIETO *et al.*, 2015).

Wu e colaboradores (2016) desenvolveram micelas poliméricas, constituídas de monometoxi-poli(etilenoglicol)-poli-ε-caprolactona, como transportadoras de SRL e avaliaram os sistemas

obtidos em um modelo de inflamação ocular em ratos *Lewis*. Ao determinar a distribuição intraocular dessas micelas, foi observado que elas inicialmente (6 horas) migraram para a retina e após 24 horas da administração as micelas se encontravam preferencialmente no EPR, indicando um movimento transretinal. Além disso, após a administração de uma suspensão dessas micelas (9 µg de SRL/olho) observou-se a formação de um depósito a partir do qual o fármaco se difunde. A formação de depósitos em fármacos lipofílicos pode comprometer o controle da liberação uma vez que o depósito não tem uma superfície definida e é dependente da constante de solubilidade do fármaco. A dissolução do fármaco dentro do humor vítreo, por sua vez, é dependente do *clearance* em tecidos oculares periféricos, incluindo retina-coroide e a *washout* pelo fluxo de fluido intraocular do corpo ciliar para a malha trabecular de drenagem e veias episcleral (PLEYER *et al.*, 2016). Nesse mesmo estudo, as micelas liberaram SRL no humor vítreo por apenas 14 dias (WU *et al.*, 2016).

No estudo conduzido por Lance e colaboradores (2015) foi desenvolvido um filme polimérico biodegradável constituído de policaprolactona (PLC) e SRL. O dispositivo liberou o fármaco por até 16 semanas, porém a concentração no humor vítreo foi baixa e relativamente constante ao longo do estudo, aproximadamente $5,2 \pm 3,1$ ng/mL ($n = 5$). O **quadro 4** mostra algumas formas farmacêuticas que vem sendo estudadas com o objetivo de reduzir a toxicidade e melhorar o perfil farmacocinético, a biodisponibilidade, a solubilidade e o perfil de liberação do SRL.

Além dos estudos apresentados, nosso grupo desenvolveu um novo implante constituído de PLGA 75:25 e SRL e sua caracterização e biocompatibilidade *in vitro* foram avaliadas (PAIVA, 2015). Os implantes foram produzidos por moldagem a quente e mostraram ausência de incompatibilidades entre o fármaco e o polímero. No estudo de liberação *in vitro* 77,87% do fármaco foi liberado em 42 dias de incubação. A avaliação da viabilidade celular, utilizando a linhagem do epitélio pigmentado da retina (ARPE- 19), demonstrou que os implantes contendo o fármaco não reduziram a viabilidade celular no período avaliado. A atividade antiangiogênica *in vivo* dos implantes, avaliada por meio do ensaio de vascularização da membrana corioalantóica, demonstrou redução significativa frente ao grupo controle. Desse modo, o sistema desenvolvido apresenta potencial não somente no tratamento da uveíte, mas também em casos de doenças causadoras da neovascularização retiniana (PAIVA, 2015).

Quadro 4 - Formas farmacêuticas de veiculação de SRL para uso oftamológico em estudo

Forma Farmacêutica	Dose	Via de administração	Animal/modelo	Resultado	Referência
Microemulsão	1 mg/mL	Tópica	Permeação em córnea de porco	Não atingiram concentrações terapêuticas no endotélio da córnea e no humor aquoso com a córnea intacta	BUECH <i>et al.</i> , 2007
Nanopartículas de quitosana/PLA	0,5%	Tópica	Transplante de córnea em coelhos	Melhor retenção na córnea do que a suspensão de SRL e excelente atividade imunossupressora	YUAN <i>et al.</i> , 2008
Filme de PEG4000/PLGA	30 ng/m	Aplicados sobre conjuntiva e esclera	Prevenção da formação de cicatriz em coelhos	Foi capaz de inibir a atividade de células inflamatórias e a atividade de fibroblastos na cirurgia de filtrante de glaucoma	YAN <i>et al.</i> , 2011
Nanomicela para aplicação anterior tópica	0,2%	Tópica	Distribuição tecidual de SRL em coelhos	Alcançou concentrações terapêuticas na córnea e íris e concentrações insignificantes nas lentes e humor aquoso.	EARLA <i>et al.</i> , 2012
Nanocarreadores contendo colesterol- poli (etileno) glicol	0,2 mg/mL	Tópica	Permeação usando esclera de porco	Permeação escleral e alta retenção	ELSAID <i>et al.</i> , 2014
Micela constituída de vitamina E TPGS e Oc-40	0,2%	Tópica	Coelhos	Concentrações elevadas de SRL foram encontradas na retina e coroide com concentrações mínimas no vítreo.	CHOLKAR <i>et al.</i> , 2014
Micropartículas de sílica, com superfície modificada	2,9 6 ± 0,37 mg	Injeção intravítrea	Coelhos	Liberção de 60% do fármaco em 30 dias, sem toxicidade.	NIETO <i>et al.</i> , 2015
Filmes de PCL para administração intraocular	0,5 a 2,0 mg	Intravítrea	Coelhos	Liberção por 16 semanas, abaixo da concentração terapêutica.	LANCE <i>et al.</i> , 2015
Micelas poliméricas (monometoxi-polietilenoglicol-poli-e-caprolactone)	9 µg	Injeção intravítrea	Inflamação ocular em ratos	Micelas permaneceram por 14 dias, efeito local com diminuição da inflamação e mínima exposição sistêmica	WU <i>et al.</i> , 2016
Microesferas de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato	200 ou 400 µg/kg	Injeção subconjuntival	Síndrome de Sjögren (olho Seco) em camundongos	Melhorou os sinais de olho seco, secreção lacrimal, diminuiu a lesão das células endoteliais da córnea e o dano histológico.	WANG <i>et al.</i> , 2018

TPGS: Succinato de alfa-tocoferol polietilenoglicol

Oc-40: Matriz polimérica Octoxynol-40

Com o objetivo de avaliar a segurança e eficácia deste implante de SRL desenvolvido, o presente trabalho determinou o perfil de liberação do fármaco, a toxicidade do sistema e a atividade anti-inflamatória em modelo de uveíte autoimune experimental.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a biocompatibilidade e eficácia anti-inflamatória de implante biodegradável preparado com copolímero ácido lático e ácido glicólico (PLGA 75:25) e sirolimus (SRL) em modelo de uveíte autoimune experimental em coelhos.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver e validar um método de análise para o SRL por meio da Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (UPLC-MS/MS) para avaliar o perfil de liberação do SRL a partir dos implantes em olhos de coelhos saudáveis.
- b) Avaliar a toxicidade do sistema desenvolvido em olhos de coelhos por meio de ensaios clínicos, eletroretinográficos, histopatológicos e moleculares.
- c) Avaliar a eficácia anti-inflamatória do sistema desenvolvido em modelo de uveíte autoimune experimental em coelhos.

CAPÍTULO I:

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE SRL EM HUMOR VÍTREO E PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS IMPLANTES DE SRL-PLGA

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Materiais

- Sirolimus (massa molar 914,2 g/mol) - RPG Life Sciences, Ltda; Mumbai, Índia.
- Polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) 75:25 [PLGA 75:25; viscosidade inerente (v.i.) = 0.50 - 0.70 dl/g] Resomer[®] RG 755 S - Boehringer Ingelheim.
- Tacrolimus (804,02 g/mol, solubilidade em água de 4-12 µg/mL - Iffect Chemphar, China).
- Ácido fórmico (Agilent, EUA).
- Acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker, EUA).
- Metanol grau cromatográfico (PanReac, Espanha).

1.2 Equipamentos

Sistema de purificação de água RiOs[®] (Millipore, EUA), balança analítica (Sartorius, Alemanha), agitador magnético (Nova Ética, Brasil), cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Agilent, EUA) contendo bomba, auto-amostrador, forno para coluna e detector de arranjo de diodos (DAD), acoplado a espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo - tempo de voo (Q-TOF), (Agilent, EUA), coluna modelo Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD com 50 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de 1,8µm (Agilent, EUA).

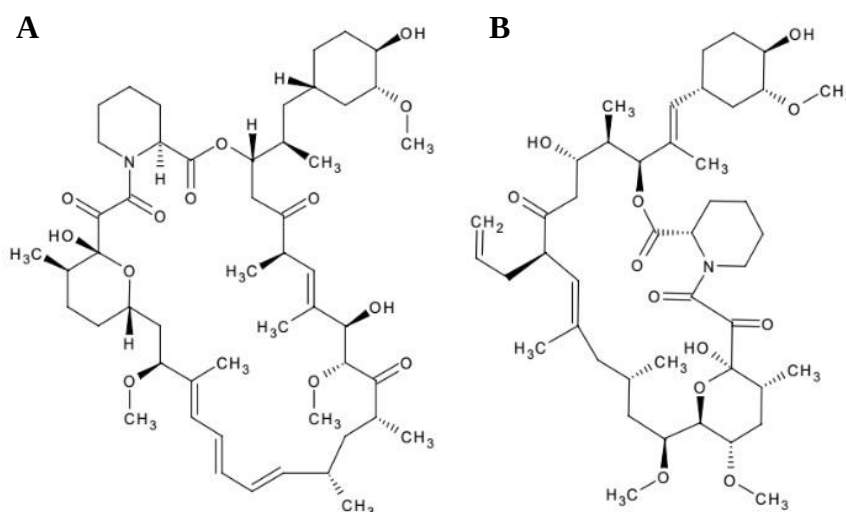
1.3 Métodos

1.3.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de sirolimus em humor vítreo por UPLC-MS/MS

O desenvolvimento do método bioanalítico por UPLC-MS/MS nesse estudo consistiu na determinação de parâmetros espectrométricos, cromatográficos e de preparo de amostra para análise de SRL liberado a partir de implantes de PLGA no humor vítreo de coelhos. A fase móvel foi constituída de água (A) e metanol (B), ambas contendo ácido fórmico 0,2% (v/v) e acetato de amônio 10 mmol/L com uma eluição em gradiente: 0 a 0,5 min: 80% B (isocrático, equilíbrio da coluna), 0,5 a 1 min: 85% B (gradiente linear), 1 a 2 min: 95% B (gradiente linear), 2 a 6 min: 100% B (lavagem da coluna). O fluxo empregado foi de 0,5 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 50°C e as amostras foram acondicionadas a 4°C no auto-injetor.

O tacrolimus (TAC) foi escolhido como padrão interno (PI) devido a sua estrutura química (**Figura 4**) e comportamento cromatográfico semelhante ao SRL. Quando comparado a outros fármacos descritos na literatura como PI, por exemplo, rapamicina deuterada (rapamicina $^{13}\text{Cd}_3$), 27-demetoxi-sirolimus, 32-demetoxi rapamicina, eritromicina, o TAC apresentou melhor custo benefício e já se encontrava disponível em nosso laboratório. Além disso, este fármaco foi utilizado como PI no trabalho de Lee e colaboradores (2010) para a quantificação de SRL no sangue de cachorro e existem outros métodos descritos na literatura em que estes dois fármacos são quantificados simultaneamente (TSZYRSZNIC *et al.*, 2013; GABRIEL *et al.*, 2016).

Figura 4 - Estrutura química do A) sirolimus e B) tacrolimus



As condições espectrométricas e cromatográficas determinadas no desenvolvimento do método estão apresentadas no **Quadro 5**.

O método desenvolvido para quantificação de SRL em humor vítreo de coelhos foi validado conforme diretrizes do guia de validação de método analítico da *European Medicines Agency* (EMA, 2011) e da resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por serem as normas vigentes mais atuais utilizadas internacionalmente e no Brasil.

Quadro 5 - Condições dos métodos cromatográfico e espectrométrico para a quantificação de SRL em humor vítreo.

Método Cromatografia Líquida			
Volume de injeção	20 µL		
Fluxo	0,5 mL/min		
Fase móvel	Ácido fórmico 0,2% + Acetato de amônio 10 mM em água: Ácido fórmico 0,2% + Acetato de amônio 10 mM em metanol (80:20)		
Tempo de corrida	6 min		
Temperatura do forno	50 ±0,8°C		
Comprimento de onda	278 nm		
Método Q-TOF			
Modo de ionização	Positivo		
Tipo da fonte	Dual ESI		
Temperatura do gás	350°C		
Fluxo do gás de secagem	7 L/min		
Fluxo do nebulizador	30 psig		
Voltagem do capilar	3350 V		
Voltagem do fragmentador	175 V		
Voltagem do <i>Skimmer</i>	79 V		
Voltagem do Oct 1 RF Vpp	750 V		
Modo de aquisição	Tageted MS/MS		
Target list	Íon precursor	Tempo de retenção	Energia de colisão
	931	1,24	12
	Íon precursor	Tempo de retenção	Energia de colisão
	821	1,21	18

1.3.2 Preparo de amostras

Para o preparo da amostra foi utilizada extração do tipo precipitação de proteínas, utilizando como agente precipitante o metanol. Foi retirada uma alíquota de 200 µL de amostra de humor vítreo e adicionado 200 µL de PI (1,03 µg/mL) em metanol. A amostra de humor vítreo ficou turva imediatamente após a adição do agente precipitante. Em seguida a amostra

foi agitada em vórtex durante 1 minuto e centrifugada por 5 min a 13.000 RPM. O sobrenadante foi retirado e filtrado com filtro de 0,22 µm para o *vial*. A área obtida foi comparada com as áreas de cromatogramas de solução padrão em metanol para ambos.

Conforme recomendação do EMA (2011) e ANVISA (2012) foi realizada a validação completa que compreendia os seguintes ensaios: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade da faixa de trabalho, precisão, exatidão e estabilidade.

1.3.3 Preparo das soluções padrão

A solução estoque de SRL na concentração de 204,0 µg/mL foi preparada com 2,04 mg do fármaco, solubilizados em metanol e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Para o TAC (PI), foram pesados 2,06 mg do fármaco, solubilizados em metanol e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Foi obtida solução estoque com concentração de 206,0 µg/mL. Uma alíquota de 50µL dessa solução foi transferida para um balão de 10 mL, obtendo-se a solução de concentração 1,03 µg/mL do PI. Soluções intermediárias de SRL foram preparadas, em metanol, a partir da diluição da solução estoque, nas concentrações de 20.000, 10.000, 5.000, 1.000, 200 e 100 ng/mL. A partir da diluição dessas soluções foram preparados *pools* de cada ponto da curva, do limite inferior de quantificação (LIQ) e de cada controle de qualidade (CQ), suficiente para realização de todos os testes de validação e adicionadas a cada amostra 200 µL de PI (1,03 µg/mL).

1.3.4 Seletividade

O método bioanalítico deve ser capaz de diferenciar o analito e o PI dos componentes da matriz biológica. A seletividade foi comprovada utilizando seis fontes individuais de matriz branca de humor vítreo, que foram analisadas individualmente em relação à presença de interferentes. Com o objetivo de avaliar a seletividade do método na concentração do LIQ foi realizada a sobreposição de seis amostras de humor vítreo brancas, matriz sintética e da amostra LIQ. Para o método ser considerado seletivo, as respostas de picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta do analito, nas amostras do LIQ, e inferiores a 5 % da resposta do PI, conforme preconizado pelo EMA (2011) e ANVISA (2012).

1.3.5 Efeito Residual

A avaliação do efeito residual foi realizada injetando amostra branca de humor vítreo aprovada no teste de seletividade, antes e após a injeção de uma amostra de limite superior de

quantificação (LSQ). Foram feitas 3 injeções de matriz branca, sendo uma antes e duas após a amostra extraída de LSQ. A especificação utilizada foi conforme disposto nos guias do EMA (2011) e ANVISA (2012), nos quais o efeito residual na amostra branca deveria apresentar área inferior a 20% da área obtida para uma amostra do LIQ.

1.3.6 Efeito Matriz

O humor vítreo é composto por água (98%) ligada a colágeno tipo II, ácido hialurônico, proteoglicanos, glicose, ácido ascórbico, aminoácidos e vários outros sais inorgânicos (LLOYD *et al.*, 2001). Devido à pequena quantidade de vítreo disponível para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico e a grande dificuldade de obtê-lo foi avaliada a possibilidade de usar uma matriz sintética como a solução salina balanceada. O **Quadro 6** apresenta a composição dessa solução.

Quadro 6 - Composição da solução da salina balanceada

Componente	Concentração (% p/v)
Cloreto de sódio	0,640%
Cloreto de potássio	0,075%
Cloreto de cálcio	0,048%
Cloreto de magnésio	0,030%
Acetato de sódio	0,390%
Citrato de sódio	0,170%

Fonte: MARTIDALE, 1989. p. 1023.

A interferência do efeito matriz foi avaliada comparando-se os coeficientes angulares entre duas curvas analíticas, sendo uma delas obtida de soluções padrão em solução salina balanceada e a outra de soluções padrão preparadas em um *pool* de humor vítreo de coelhos.

Para a confecção da curva em *pool* de humor vítreo, após adição de volumes apropriados das soluções intermediárias, as soluções resultantes passaram pelo mesmo tratamento que as amostras preparadas em salina balanceada: adição de 200 µL de PI, 30 segundos de agitação em vórtex, 5 minutos de centrifugação a 13.200 RPM e filtração em membrana 0,22 µm do sobrenadante.

1.3.7 Linearidade da faixa de trabalho

A resposta do instrumento em relação à resposta do analito foi avaliada para uma faixa de concentração específica. Os padrões de calibração foram preparados na mesma matriz que foi

utilizada nas amostras do estudo, por meio da contaminação da matriz com concentrações conhecidas do analito.

Foram seguidas as diretrizes do EMA (2011) e ANVISA (2012), para avaliação da linearidade da faixa de trabalho. A curva de calibração foi elaborada com 7 níveis de concentração devido à ampla faixa de trabalho utilizada no estudo, e para que a distribuição dos pontos fosse homogênea. Foram realizadas 3 curvas diferentes em 3 dias consecutivos.

A avaliação da precisão e exatidão do método foi realizada concomitante à análise dos pontos da curva (25, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000 ng/mL). Assim, foram injetadas amostras em sextuplicata nas concentrações do LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD (25, 40, 800, 1600 e 2000, respectivamente).

A linearidade da faixa de trabalho, a precisão e a exatidão do método foram avaliadas empregando a seguinte sequência analítica:

- a) 2 amostras Branco;
- b) 2 amostras Zero (amostra branco adicionada de PI);
- c) 2 amostras de cada um dos 7 níveis de concentração da curva de calibração;
- d) 6 amostras de LIQ;
- e) 6 amostras de CQB;
- f) 6 amostras de CQM;
- g) 6 amostras de CQA;
- h) 6 amostras de CQD.

O modelo matemático mais simples, o linear, foi adotado. Foram aceitos desvios menores ou iguais a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ e menores ou iguais a 15% para os outros níveis de concentração. Ainda, 75% dos pontos de calibração devem estar aprovados, havendo no mínimo 6 pontos de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, conforme preconizado pelo EMA (2011).

1.3.8 Precisão, exatidão e recuperação

A precisão de um método analítico descreve a proximidade de repetidas aferições de múltiplas alíquotas do analito. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e foi avaliada para o LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD dentro de uma mesma corrida (intracorrída) e entre corridas diferentes (intercorrída) utilizando a equação 1:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (\text{equação 1})$$

A exatidão consiste, por sua vez, na concordância entre o valor determinado em um ensaio e o valor da concentração nominal do analito. A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR) e foi avaliada para o LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD intracorrida e intercorrida (EMA, 2011; ANVISA, 2012), conforme a equação 2:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad (\text{equação 2})$$

A precisão e exatidão intracorrida foram realizadas com seis amostras de cada concentração dos CQs e do LIQ. A precisão e exatidão intercorrida foi avaliada em 3 corridas diferentes, realizadas em 3 dias distintos.

Foi utilizada a especificação preconizada pelo EMA (2011) e ANVISA (2012) nas quais o método é considerado preciso e exato se o CV% e o EPR forem inferiores a 15% para as amostras de CQs e a 20% para o LIQ.

A avaliação da exatidão e precisão intracorrida e intercorrida foram realizadas simultaneamente à determinação da linearidade da faixa de trabalho.

1.3.9 Estabilidade

A avaliação da estabilidade foi realizada a fim de garantir que todas as etapas durante o processo de preparo da amostra, assim como as condições de estocagem, não afetariam a concentração do analito. Os testes foram aplicados de modo que as condições avaliadas fossem similares àquelas nas quais as amostras do estudo seriam submetidas, conforme disposto no EMA (2011).

A estabilidade do SRL foi demonstrada em quatro condições específicas: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC); estabilidade de curta duração (ECD); estabilidade de longa duração (ELD) e estabilidade pós-processamento (EPP). A estabilidade do analito na matriz biológica foi avaliada utilizando 6 amostras de CQA e CQB que foram analisadas imediatamente após o preparo e nas condições de estocagem que seriam aplicadas durante o teste.

As concentrações obtidas foram comparadas aos valores determinados para amostras recém-preparadas, e a concentração média de cada CQ, para atender aos requisitos do EMA (2011) e ANVISA (2012), deveria ser pelo menos 15% do valor nominal.

a) Estabilidade de curta duração

Com base no tempo durante o qual as amostras poderiam ficar na bancada no estudo de farmacocinética, foi determinado o período de 6 horas para a análise de estabilidade de curta duração. Dessa forma, 6 amostras de CQB e CQA ficaram nas condições de trabalho, 25°C, durante esse período e em seguida foram extraídas e analisadas.

b) Estabilidade de longa duração

As amostras de CQB e CQA foram extraídas e analisadas após 60 dias armazenadas em freezer a -80°C. Esse período foi determinado com base na estimativa do tempo durante o qual as amostras de humor vítreo extraído dos animais ficariam armazenadas até a análise. As amostras foram descongeladas, extraídas e analisadas após o período mencionado.

c) Estabilidade pós-processamento

No ensaio EPP, 6 amostras de CQB e CQA foram analisadas após permanecerem no amostrador automático na temperatura de 4°C, durante 24 horas.

d) Estabilidade de ciclos congelamento-descongelamento

O ensaio de ECC avaliou a estabilidade dos analitos em humor vítreo após três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento completo à temperatura ambiente de trabalho. A cada ciclo, as amostras foram mantidas congeladas por no mínimo 12 horas. Seis amostras de CQB e CQA foram extraídas e analisadas após o último descongelamento.

e) Estabilidade do analito e PI em solução

A estabilidade do analito e PI foi avaliada em pelo menos 6 amostras da solução primária de maior concentração, LSQ, e da solução de trabalho de menor concentração, LIQ, por período superior ao previsto para o estudo, conforme preconizado pela ANVISA (2012). As soluções de LIQ e LSQ foram preparadas em triplicata e cada solução foi fracionada em dois *vials* novos lacrados, de modo que um foi analisado imediatamente e o outro foi mantido nas condições de trabalho (25°C) durante 5 horas para então ser analisado. O mesmo procedimento foi realizado para a solução de PI de 5.000 ng/mL, diluída seis vezes, conforme

diluição prevista no ensaio. A estabilidade foi avaliada de acordo com a resposta obtida para cada solução analisada. As áreas foram comparadas e a variação foi calculada de acordo com a equação 3:

$$\text{Variação \%} = \frac{(\text{Área média solução armazenada} - \text{Área média solução recém-preparada}) \times 100}{\text{Área média solução recém-preparada}} \quad (\text{equação 3})$$

Para as soluções serem consideradas estáveis os desvios encontrados devem ser menores do que 10%.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de SRL em humor vítreo por UPLC-MS/MS

Várias técnicas analíticas, como HPLC, LC-MS e LC-MS/MS, já foram descritas na literatura para a quantificação de SRL em diferentes matrizes biológicas e com procedimentos de extração do fármaco variados (TAYLOR; JOHNSON, 1998; LEE *et al.*, 2010; MOELLER *et al.*, 2012; HOU *et al.*, 2015). No entanto, a quantificação de fármacos no humor vítreo, a partir de sistemas de liberação prolongada, depende de métodos com elevada sensibilidade e de um preparo de amostra simples, uma vez que o vítreo é considerado uma matriz biológica “limpa” quando comparado ao sangue ou urina. Desta forma, tornou-se necessário o desenvolvimento e validação de um método analítico sensível e seletivo para a quantificação de SRL a partir de implantes poliméricos de SRL-PLGA em humor vítreo dos animais empregados no estudo.

Para definição das condições espectrométricas, primeiramente foram obtidos espectros de varredura sem fragmentação (método de aquisição *MS only* no software *Mass Hunter* da Agilent), do SRL e do TAC (PI), para determinação dos picos bases de cada composto (**Figura 5A para o SRL e 7A para o TAC**). Em seguida, as amostras foram analisadas no modo de aquisição do tipo *targeted MS/MS* (**Figura 5B para o SRL e 7B para o TAC**), no qual foram selecionados como íons precursores e tempos de retenção aqueles referentes aos picos base do SRL e TAC observados na etapa anterior. Assim, diferentes valores de energia de colisão foram testados até obtenção da melhor razão íon fragmento/íon precursor, de forma que a abundância do íon fragmento fosse a maior possível. Diferentes valores de voltagem do *Skimmer* e do capilar foram testados até obtenção do espectro no qual houvesse maior abundância dos íons de interesse. Foi utilizado durante todo este processo o modo de ionização positivo.

O espectro de varredura do SRL teve como pico base o aduto de amônio, que apresenta m/z de 931,6 (**Figura 5A**). Ao submeter esse íon a diferentes energias de colisão foi observada a predominância do íon de m/z 864,5, que foi mais abundante na EC de 12 V (**Figura 5B**). Dessa forma, foi monitorada a transição m/z 931,6 $\rightarrow$ 864,5. Taylor e Johnson (1998) propuseram a fragmentação do aduto de amônio do SRL 931,6 gerando quatro fragmentos, dentre eles o de m/z 864,5 (**Figura 6**).

Figura 5 – Espectros MS do SRL (A) e MS/MS do íon m/z 931,6 com energia de colisão de 12 V (B).

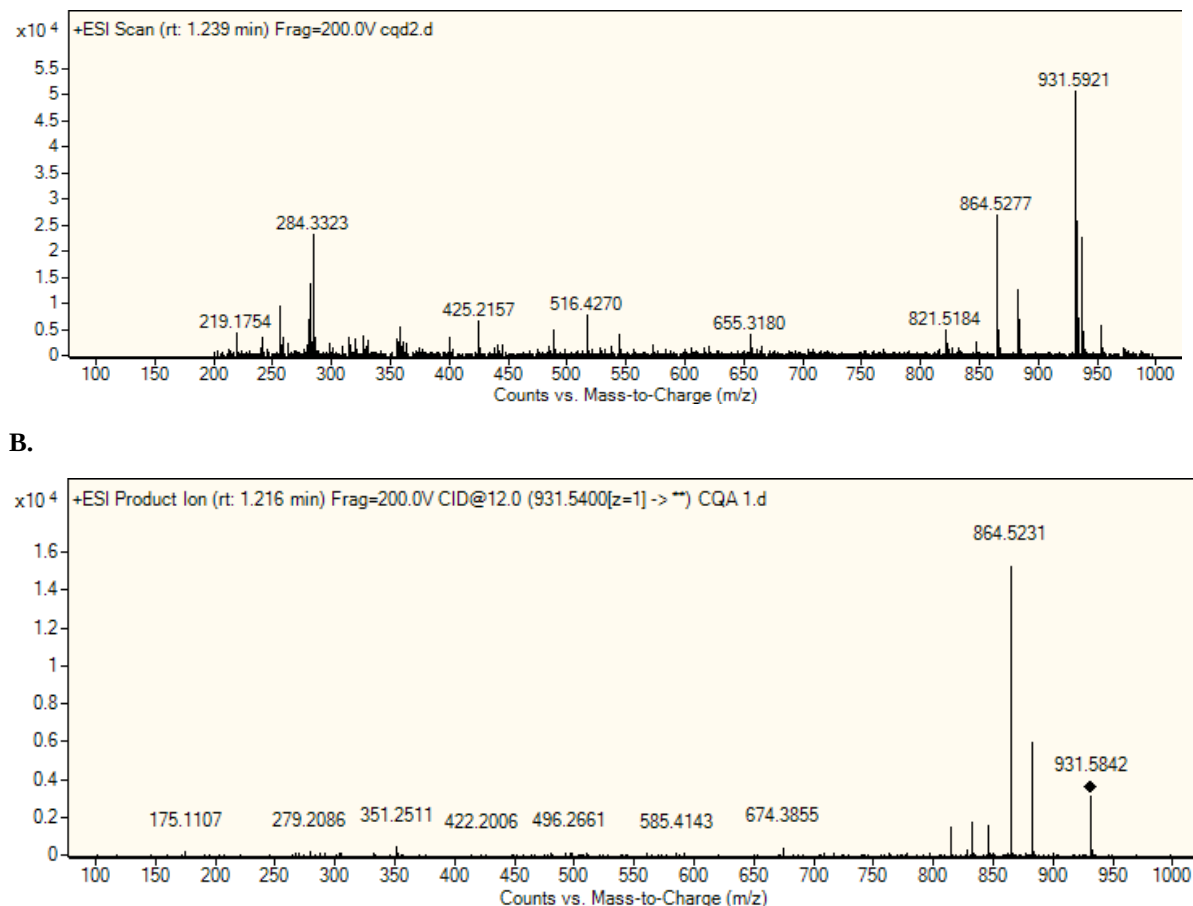
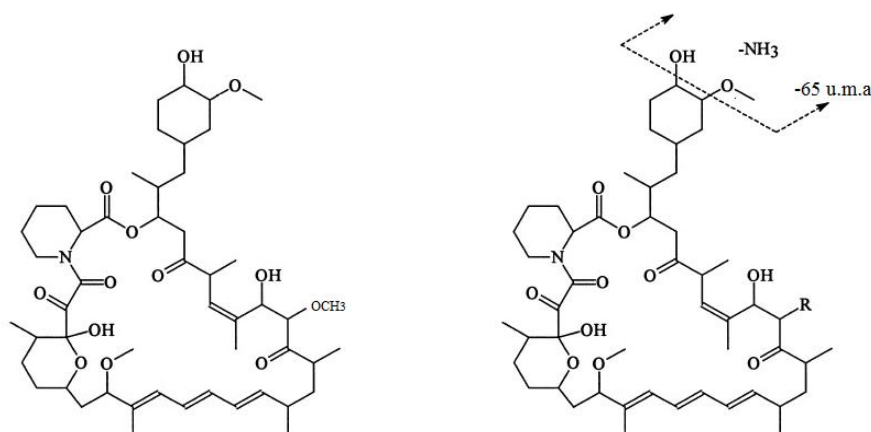


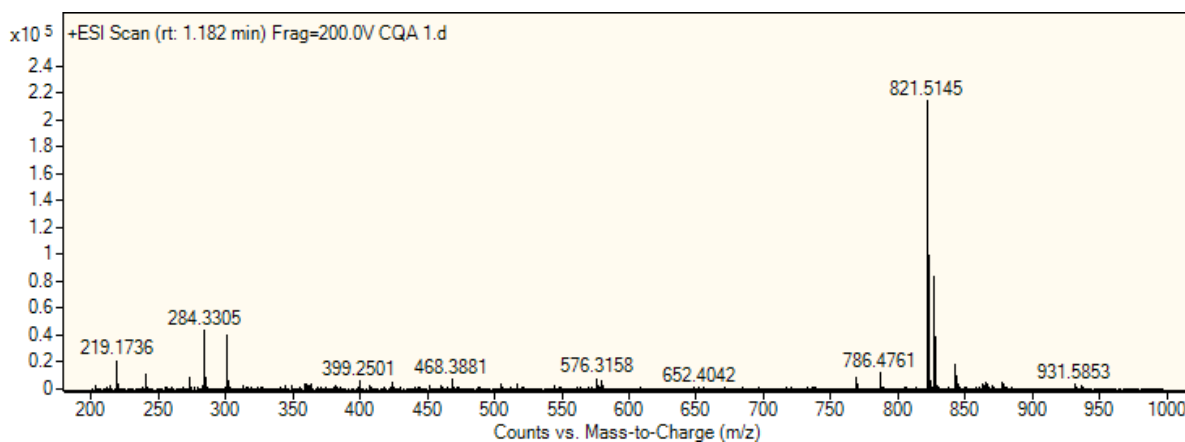
Figura 6 - Possível sítio de fragmentação do aduto de amônio do SRL gerando o fragmento com razão massa/carga de 864,5. Adaptado de TAYLOR; JOHNSON, 1998.



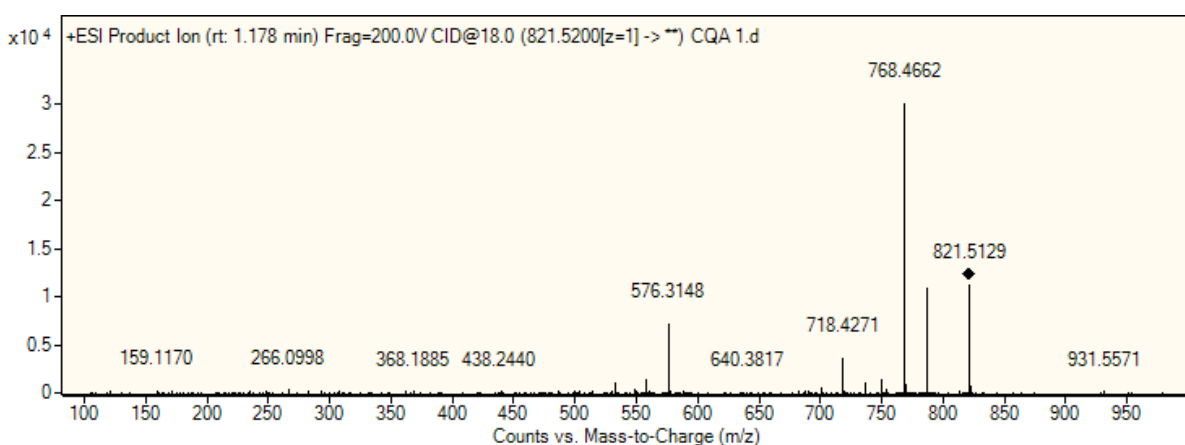
Para o TAC a varredura também mostrou como pico base o aduto de amônio com m/z de 821,5 (**Figura 7A**). Ao fragmentar esse íon, verificou-se a predominância do íon com m/z 768,4, que apresentou maior abundância na EC de 16 V (**Figura 7B**). Dessa forma, foi monitorada a transição m/z 821,5 $\rightarrow$ 768,4.

Figura 7 – Espectros de MS do TAC obtido sem fragmentação (A) e com fragmentação do íon m/z 821,5 com energia de colisão de 16 V (B)

A.



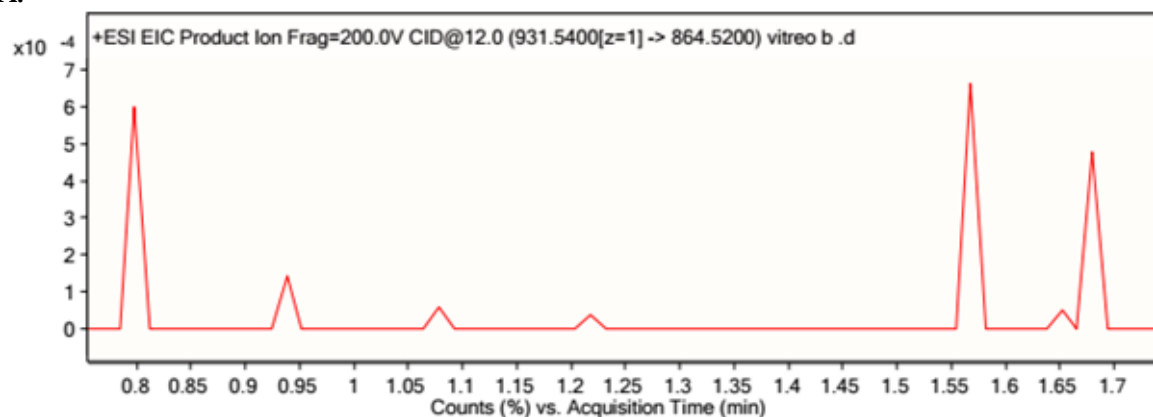
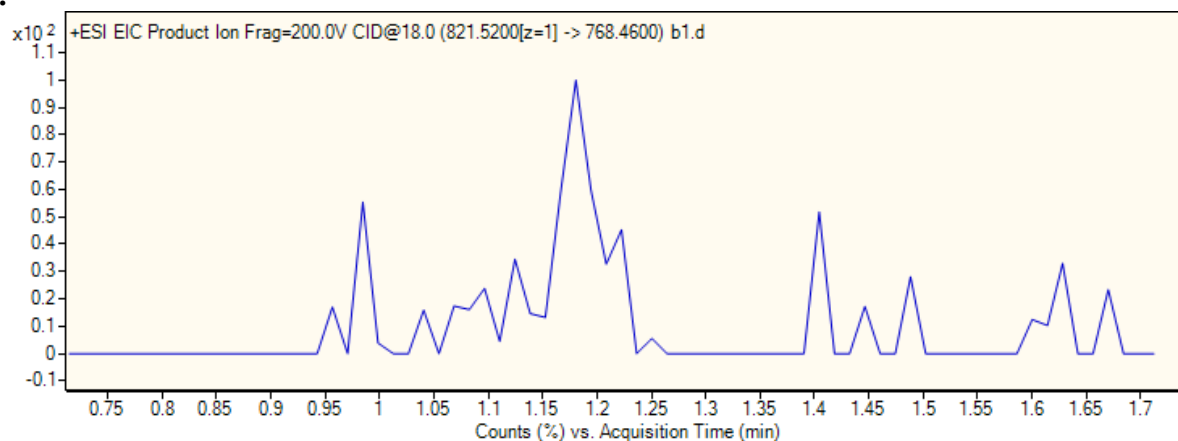
B.



2.1.1 Seletividade

Na **Figura 8** pode-se observar que para o método desenvolvido não foi identificado nenhum pico interferente no mesmo tempo de retenção do SRL ou do TAC. Em ambos os cromatogramas obtidos, observa-se apenas o ruído da linha de base, comprovando a seletividade do método bioanalítico para a quantificação desses analitos em humor vítreo.

Com o objetivo de avaliar a seletividade do método na concentração do limite inferior de quantificação (25 ng/mL) foi realizada a sobreposição de uma amostra branca, matriz sintética e da amostra LIQ, como demonstrado na **Figura 9**. Pode-se observar que não houve nenhum interferente com área superior a 20% em relação ao SRL e de 5% para o TAC, bem como o sinal de um fármaco não interferiu na transição do outro. Dessa forma, o método mostrou seletividade adequada para o fim proposto.

Figura 8 - Cromatogramas das amostras de vítreo branco do SRL (A) e do padrão interno (B)**A.****B.**

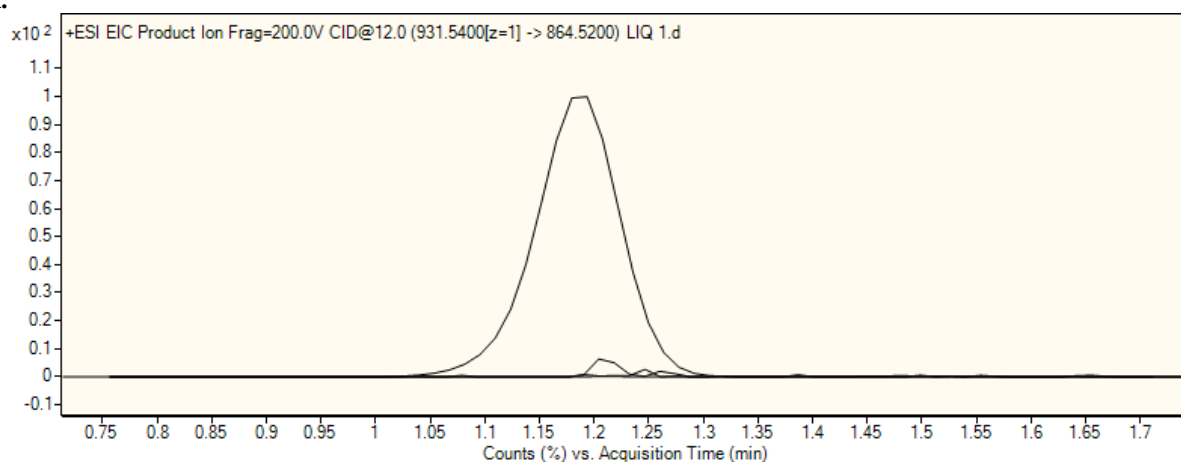
2.1.2 Efeito Residual

O efeito residual foi avaliado injetando em uma mesma sequência uma amostra de vítreo branco, uma amostra de LSQ e mais duas injeções de vítreo branco, como demonstrado na **Figura 10**. Nenhum interferente com área superior a 20% em relação ao LIQ foi observado, comprovando a ausência de efeito residual no método.

A fim de garantir que durante as análises de rotina não ocorresse efeito residual, o método desenvolvido possui um tempo de 4 minutos de pós-corrida, além de lavagens da agulha durante 20 segundos com acetonitrila entre cada injeção.

Figura 9 - Cromatogramas sobrepostos das amostras branco e matriz sintética com o LIQ (A) e com o PI (B) obtidos para a avaliação da seletividade do método bioanalítico para quantificação de SRL em humor vítreo.

A.



B.

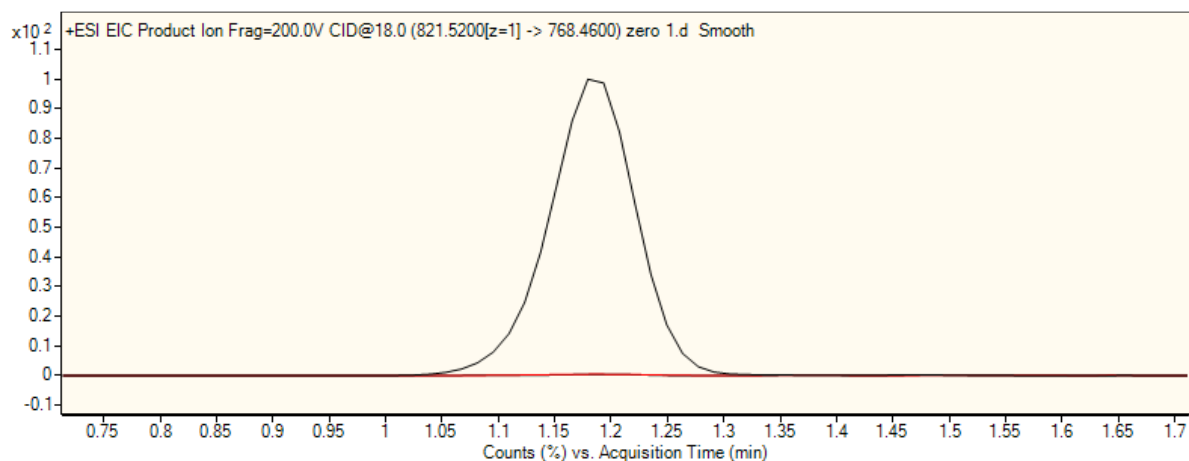
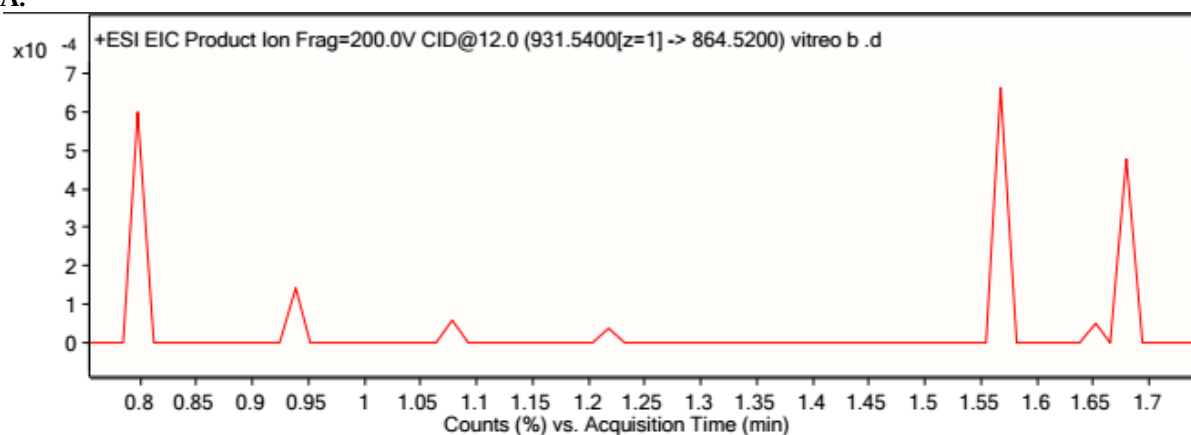
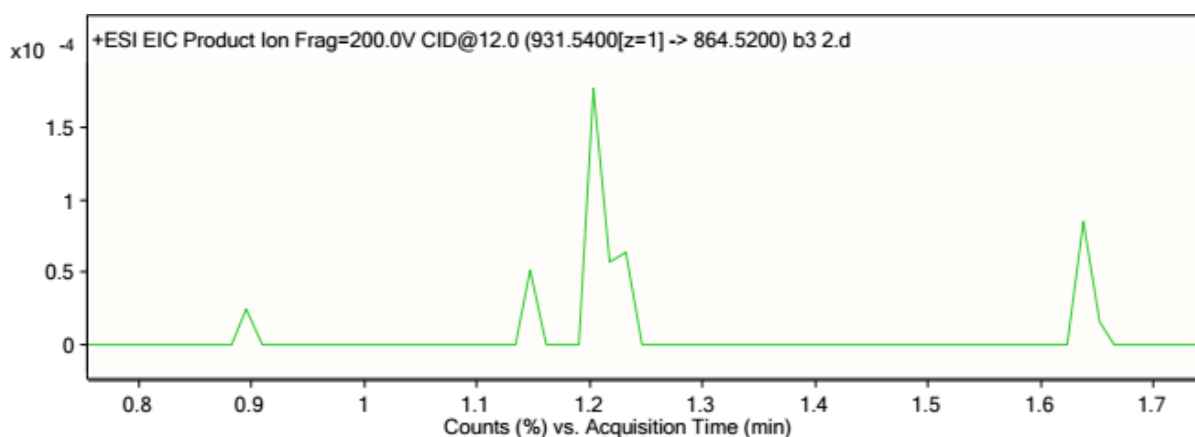


Figura 10 – Cromatogramas obtidos para as amostras branco (A) antes e após (B) injeção do LSQ no teste de efeito residual.

A.



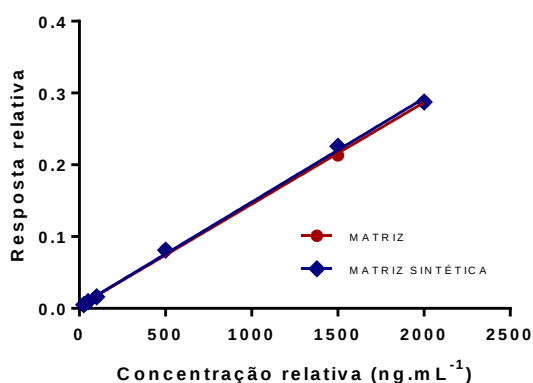
B.



2.1.3 Efeito Matriz

Na **Figura 11** são apresentadas as duas curvas analíticas obtidas para o SRL em matriz sintética. Não houve diferença estatística (Teste F de variância) para os coeficientes angulares das duas curvas, sendo assim, a matriz não interfere na determinação do SRL por esse método. Dessa forma, todas as curvas analíticas, CQs e LIQs utilizadas nas quantificações do SRL em amostras de humor vítreo passaram a ser preparadas em solução salina balanceada.

Figura 11 – Gráficos das curvas obtidas no estudo de efeito matriz em humor vítreo e matriz sintética.



2.1.4 Linearidade da faixa de trabalho

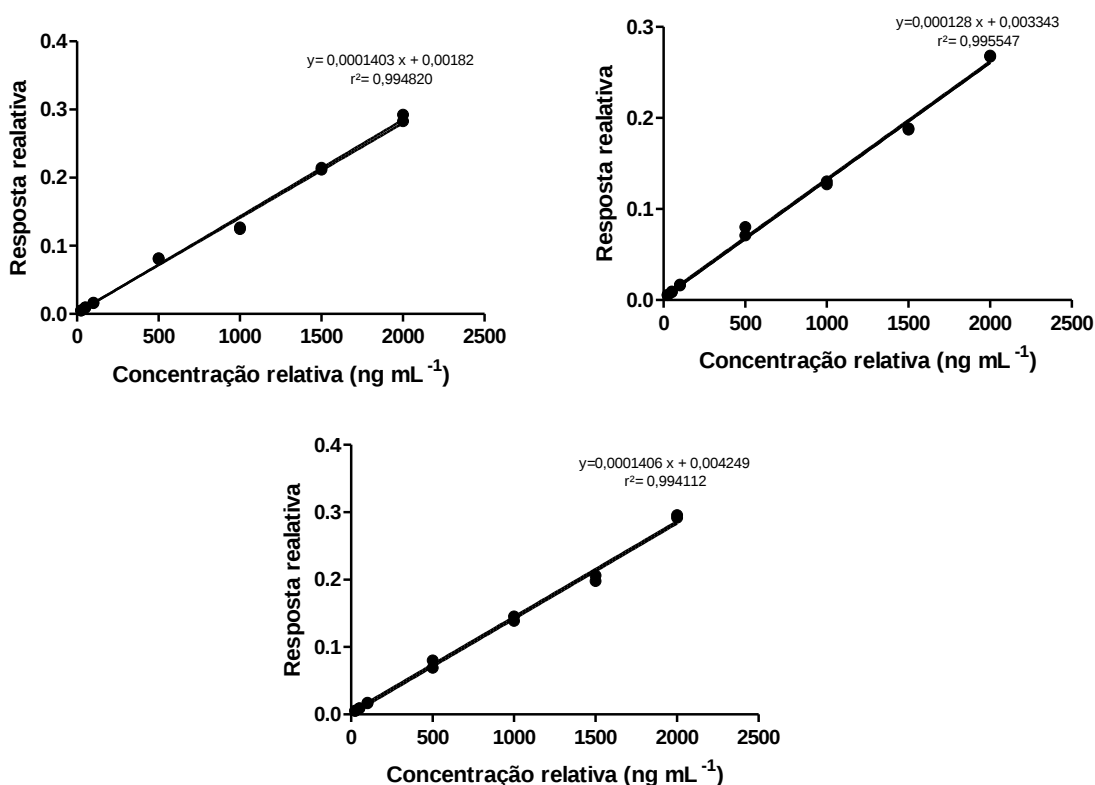
A **Figura 12** apresenta as três curvas de calibração de sete pontos para o SRL, cada um em duplicata, obtidas em matriz sintética na faixa de 25 a 2000 ng/mL, plotadas pela resposta (área do fármaco/área do padrão interno) versus a concentração do fármaco, sem ponderação. As curvas foram extraídas e analisadas em três dias consecutivos e indicaram correlação linear adequada para o SRL, na faixa de concentração avaliada. Não foram observados picos

interferentes com área superior a 20% do LIQ no TR do SRL e acima de 5% da área do TAC no TR, nas amostras branco. As amostras zero apresentaram área correspondente ao PI com valor semelhante ao encontrado nas demais amostras. As equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação e determinação estão demonstrados na **Tabela 1**. Os dados obtidos para as curvas analíticas do SRL nos três dias, curvas 1, 2, e 3, estão demonstrados na **Tabela 2**.

Tabela 1 – Equações das retas e respectivos coeficientes de determinação e correlação obtidos para o SRL, na avaliação da linearidade do método bioanalítico.

Curva de calibração	Equação da reta	r^2	R
Curva 1	$y = 0,00014 \cdot x + 0,0018$	0,9948	0,9974
Curva 2	$y = 0,00012 \cdot x + 0,0033$	0,9955	0,9978
Curva 3	$y = 0,00014 \cdot x + 0,0042$	0,9941	0,9970

Figura 12 – Gráficos das curvas de calibração 1, 2 e 3 obtidas no estudo de linearidade da faixa de trabalho para a validação do método bioanalítico de quantificação de SRL em humor vítreo.



2.1.5 Precisão, exatidão e recuperação

A precisão intra e inter-dia e a exatidão foram analisadas em sextuplicata dos CQ em três dias consecutivos e estão representadas na **Tabela 3**. A média do desvio padrão foi de 6,6 e 6,73%

para a precisão intra-dia e inter-dia, respectivamente. Já para a exatidão o erro relativo médio foi de 4,77 e 2,45% para a avaliação intra-dias e inter-dias, respectivamente. Os parâmetros de processamento e extração forneceram recuperação superior a 90%. Os dados obtidos estão dentro dos limites aceitáveis e cumprem as diretrizes para validação de métodos bioanalíticos.

Tabela 2 – Dados obtidos para a construção das curvas analíticas de SRL nos 3 dias de análise.

Conc. Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)			Média Concentração Obtida (ng/mL)	Exatidão (%)	CV (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3			
25,00	22,34	25,12	24,58	24,01	96,05	6,13
	24,26	27,72	29,34	27,11	108,43	9,56
50,00	56,96	54,00	53,43	54,80	109,60	3,45
	52,66	48,27	53,29	51,41	102,81	5,31
100,00	104,52	107,04	104,32	105,30	105,30	1,44
	99,64	102,02	112,69	104,78	104,78	6,63
500,00	560,94	493,07	478,49	510,83	102,17	8,61
	569,45	559,54	557,36	562,12	112,42	1,15
1000,00	891,88	892,67	976,92	920,49	92,05	5,31
	873,97	915,57	1023,69	937,74	93,77	8,24
1500,00	1496,04	1331,88	1397,58	1408,50	93,90	5,87
	1516,49	1321,57	1456,27	1431,44	95,43	6,97
2000,00	2070,96	1892,60	2095,21	2019,59	100,98	5,48
	2001,68	1900,66	2067,73	1990,02	99,50	4,23

Tabela 3 - Valores de precisão e exatidão para SRL por UPLC–MS/MS.

	Concentração nominal (ng/mL)				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
	25	40	800	1600	2000
(A) Precisão e exatidão intra-dias (n = 6)					
Concentração média	26,56	41,53	736,56	1589,98	2081,03
DPR(%)	9,86	7,13	3,56	7,02	5,46
ER(%)	6,25	3,83	-9,10	-0,63	4,05
(B) Precisão e exatidão inter-dias (n = 18)					
Concentração média	25,14	40,06	766,54	1640,45	2097,04
DPR(%)	8,42	7,75	6,94	6,53	4,01
ER(%)	0,55	0,16	-4,18	2,53	4,85
Recuperação (%)	102,87	105,8	91,47	94,42	104,85

DPR: Desvio Padrão Relativo (%), n=6 ou 18

ER: Erro Relativo (%), n=18

O método desenvolvido apresentou uma recuperação alta e reprodutível para o SRL por este método de extração. Vários protocolos de extração do SRL descritos na literatura como precipitação de proteína, extração líquido-líquido e uma combinação desses com diferentes solventes como acetato de etila, éter metil-terc-butílico, trietilamina, acetonitrila e metanol foram testados. No entanto, devido a baixa faixa de trabalho pretendida e pelo fato do vítreo ser uma matriz biológica simples, apenas a adição de metanol foi suficiente para a precipitação de proteínas. A recuperação de SRL encontrada foi entre 90 e 105%.

2.1.6 Estabilidade

Para avaliar a estabilidade das amostras na matriz sintética essas foram submetidas a diferentes condições de armazenamento simulando o que poderia acontecer durante a quantificação do fármaco no humor vítreo. Para avaliar a estabilidade de curta duração amostras de CQA e CQB em sextuplicada foram deixadas sobre a bancada por seis horas à temperatura ambiente, sendo em seguida submetidas ao processo de extração. Como a variação foi inferior a 15%, segundo preconizado pela legislação, não houve diferença significativa entre essas amostras e aquelas que haviam sido recém-preparadas, como demonstrado na **Tabela 4**.

Para avaliar a estabilidade pós-processamento, as amostras permaneceram no amostrador após o preparo por até 24 horas à 4°C. Também não foi observada diferença significativa quando comparada às amostras recém-preparadas. Nenhuma amostra foi mantida no autoinjeter por período superior a 24 horas durante o estudo de farmacocinética. Após três ciclos de congelamento-descongelamento as amostras de CQA e CQB demonstraram estabilidade, com desvios inferiores a 15%.

As amostras CQA e CQB contendo SRL foram armazenadas em freezer -80 °C por 60 dias e após esse período foram descongeladas em temperatura ambiente, extraídas com a adição de PI, analisadas e comparadas com uma amostra recém-preparada. Durante o estudo de farmacocinética, nenhuma amostra permaneceu congelada a -80°C por período superior a 60 dias.

As áreas obtidas para o SRL em solução nas concentrações do CQB e CQA, uma semana após o preparo, foram comparadas às áreas obtidas das amostras recém-preparadas e os resultados demonstraram que as variações foram inferiores a 10%, conforme disposto na **Tabela 5**. As

Tabela 4 – Concentrações médias e coeficientes de variação (CV%) calculados no estudo de estabilidade de curta duração, longa duração, ciclos de congelamento-descongelamento e pós-processamento para a validação do método bioanalítico de quantificação de SRL em humor vítreo.

	Concentração nominal (ng/mL)	
	CQB 40	CQA 1600
(A) Estabilidade de curta duração, 6h à temperatura ambiente		
Concentração média	38,38	1606,63
DPR(%)	7,03	3,81
ER(%)	-4,05	0,41
(B) Estabilidade pós-processamento, 4°C por 24 h		
Concentração média	40,22	1535,30
DPR(%)	6,58	2,50
ER(%)	0,54	-4,04
(C) Estabilidade de ciclos congelamento-descongelamento (3 ciclos)		
Concentração média	43,34	1563,44
DPR(%)	4,69	8,66
ER(%)	8,34	-2,28
(D) Estabilidade de longa duração 60 dias		
Concentração média	38,87	1743,20
DPR(%)	4,94	5,31
ER(%)	-2,83	8,95

DPR: Desvio Padrão Relativo (%), n=6
ER: Erro Relativo (%), n=6

Tabela 5 – Áreas médias obtidas no estudo de estabilidade do SRL e TAC em solução na temperatura de trabalho e respectivos coeficientes de variação (CV%).

Estabilidade do analito e PI em solução						
	SIROLIMUS				TACROLIMUS	
	CQB Recém- preparada	CQB Teste	CQA Recém- preparada	CQA Teste	PI Recém- preparada	PI Teste
Área média	1494	1423	43189	43204	103568	103374
DPR(%)	8,45	0,88	2,18	5,03	0,37	5,65
Variação (%)	-4,79		0,03		-0,19	

áreas obtidas para o TAC também apresentaram variações inferiores a 10% comparadas às áreas das amostras recém-preparadas, não havendo diferenças significativas entre elas.

Após avaliação dos tipos de estabilidade preconizados, verificou-se que as amostras de vítreo contendo o SRL são estáveis por até 6 horas à temperatura ambiente, por 24 horas no injetor automático após extração, após 60 dias em freezer a -80 °C e após três ciclos de congelamento/descongelamento. A análise dos resultados obtidos demonstra estabilidade do SRL e TAC nas amostras de matriz sintética.

3 CONCLUSÃO

O método bioanalítico desenvolvido em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial mostrou-se simples, rápido e sensível, reprodutível, com baixo limite de quantificação de 25 ng/mL, com curto tempo de corrida cromatográfica de 6,0 min e alta seletividade, possibilitando a quantificação do SRL em vítreo de coelhos. O método de extração aplicado, de precipitação de proteínas, mostrou-se de fácil e rápida execução, além de eficiente em extrair o fármaco das amostras. O método foi então aplicado em um estudo de liberação de SRL em olhos de animais.

CAPÍTULO II:

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO, TOXICIDADE E BIOCOMPATIBILIDADE DOS IMPLANTES DE SRL-PLGA

*O conteúdo descrito neste capítulo foi publicado no periódico *Documenta Ophthalmologica* (**Anexo II**)

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais com animais foram realizados em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). Os estudos de liberação do SRL em humor vítreo e toxicidade foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo 04/2016 (ANEXO I).

Para a avaliação do perfil de liberação, avaliação clínica, eletrorretinografia e histologia do sistema desenvolvido, foram utilizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*, pesando entre 2 e 3 kg, mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração e água *ad libitum*, com ciclo claro-escuro respeitado. Os animais foram mantido no biotério da Faculdade Farmácia da UFMG.

1.2 Preparo dos implantes

Os implantes foram preparados a partir da mistura liofilizada composta por 75% de PLGA 75:25 e 25% de SRL, conforme Paiva (2015). Inicialmente, o fármaco e o polímero foram solubilizados em quantidade suficiente de acetonitrila, a solução foi então congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 24 horas (liofilizador modelo K105, Biobrás). Em seguida, a mistura liofilizada homogênea de pós foi moldada de acordo com a técnica de moldagem desenvolvida por Fialho *et al.* (2007) na forma de bastões com aproximadamente 0,45 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento utilizando uma placa de Teflon[®] aquecida na temperatura entre 100 e 120°C.

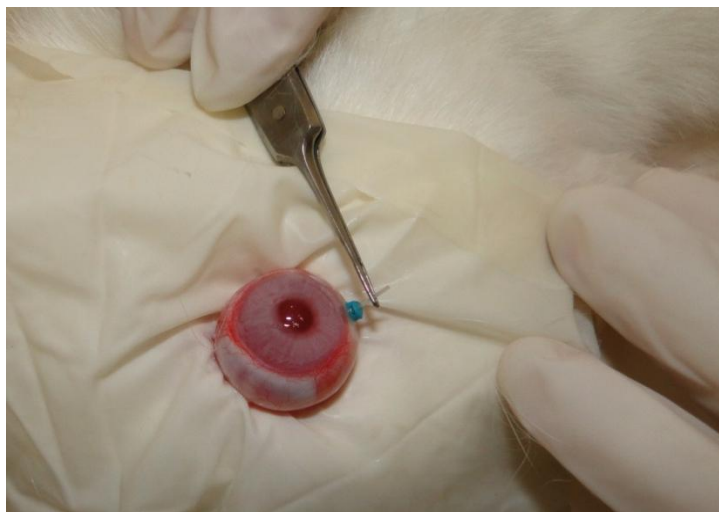
1.3 Inserção dos implantes na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos

Os animais foram anestesiados utilizando-se injeção intramuscular de 30mg/Kg de Cloridrato de Ketamina (Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, Brasil), 4,0 mg/Kg de Cloridrato de Xilasina (Anasedan[®], Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, Brasil), e instilação tópica de Cloridrato de Tetracaína 1% e Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio[®], Allergan).

Para a implantação do sistema, um trocar de 25 gauge foi utilizado. A cânula transescleral foi colocada através da *pars plana* do olho no quadrante temporal superior pela qual o implante

de SRL-PLGA foi inserido (**Figura 13**). Não foi observado sangramento no olho que recebeu o implante. O olho esquerdo foi utilizado como controle do experimento.

Figura 13 - Inserção dos implantes através da *pars plana* do olho no quadrante temporal superior utilizando trocar 25G.



1.4 Perfil de liberação

Para determinar o perfil de liberação dos implantes de SRL-PLGA, trinta e dois coelhos receberam o implante no olho direito. Os olhos esquerdos não receberam o sistema e serviram como controle. Os animais ($n=4$, para cada semana) foram eutanasiados com uma sobredose letal de pentobarbital por via venosa (veia marginal da orelha esquerda) e o vítreo foi coletado em oito tempos diferentes (entre 1 a 8 semanas) após a administração do implante de SRL-PLGA. O vítreo foi completamente removido usando uma agulha de 26 *gauge* e uma seringa de 1mL e imediatamente acondicionado a -80°C até a realização da análise das amostras utilizando o método descrito no **Capítulo I**.

Os parâmetros farmacocinéticos, como a concentração máxima de fármaco (C_{max}), o tempo para se alcançar a concentração máxima de fármaco (T_{max}), e a área sob a curva (ASC, *Area Under the Curve*), foram calculados usando o *software* GraphPad Prism (GraphPad *software*, San Diego, CA).

1.5 Avaliação clínica

A avaliação clínica e os exames eletrorretinográficos foram feitos em oito animais diferentes daqueles usados no estudo farmacocinético. Os animais foram separados em 2 grupos: grupo I ($n=4$) recebeu implante de SRL-PLGA; grupo II ($n=4$) recebeu implante de PLGA; os olhos

esquerdos dos dois grupos não receberam o sistema (olho controle). Os animais foram observados clinicamente por um veterinário especialista em oftalmologia e fotografados durante todo o experimento. A avaliação clínica incluiu inspeção ocular e oftalmoscopia binocular indireta (Omega 500 Binocular Indirect Ophthalmoscope, Heine Optotechnik, Herrsching, Alemanha) antes e após a inserção dos implantes até a oitava semana. A pressão intraocular (PIO) foi avaliada utilizando o tonômetro TonoPen XL (Reichert Technologies, Buffalo, NY) e imagens da retina foram capturadas com o emprego do *Clearview Optical Imaging System* (Optibrand, Ft. Collins, CO).

A mudança da PIO foi calculada subtraindo o valor obtido da PIO das semanas 1 a 8 pelo valor obtido antes da implantação dos sistemas com o fármaco (média de 3 leituras para cada olho).

1.6 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma de campo total (ERG)

Os registros de ERGs foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pela ISCEV (*International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) (ODOM *et al.*, 2016; ROBSON *et al.*, 2018). Os coelhos foram mantidos em uma sala escura por pelo menos duas horas para adaptação ao escuro antes da anestesia. Os animais foram então anestesiados por injeção intramuscular de 2mg/kg de xilasina e 10 mg/kg de ketamina. A pupila foi dilatada com colírio de tropicamida 1%, 15 minutos antes do início do exame. Os olhos testados foram constantemente lubrificados com metilcelulose 2%.

As respostas ERG foram adquiridas nos dois olhos simultaneamente utilizando eletrodo bipolar do tipo lente de contato sobre a córnea (eletrodos ERG Jet, Fabrinol SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça); eletrodos do tipo agulha foram fixados subcutâneo na pele perto do canto lateral de ambos os olhos e utilizados como referência e o eletrodo-terra foi fixado subcutâneo no dorso do animal. A impedância do eletrodo foi verificada antes e após cada medição e foi inferior a 5 k Ω a 25 Hz. Os olhos foram estimulados usando um estimulador de LED Ganzfeld (ColorDome™ desktop Ganzfeld, Diagnosys LLC, Littleton, MA).

Flashes de luz branca (6500K) com duração de 4 ms foram conduzidos em três diferentes steps com aumento da intensidade luminosa:

- 1) Flashes de 0,01 cd.s/m² com 30 segundos de intervalo entre cada flash;
- 2) Flashes de 3 cd.s/m² com 30 segundos de intervalo entre cada flash;

- 3) Flashes de 10 cd.s/m² com 30 segundos de intervalo entre cada flash;

O potencial oscilatório (PO) foi obtido a partir da resposta do flash de 3 cd.s/m² por meio de uma transformada de Fourier rápida com filtragem de 60 a 300 Hz. O valor absoluto da área sob a curva para todos os PO foi determinado entre os tempos implícitos das ondas a e b.

Após 10 minutos de adaptação à luz (luz de fundo de 30 cd.s/m²), foram realizados estímulos de ERG adaptadas à luz com flashes de intensidade luminosa de 3 cd.s/m² e duração de 4 ms, seguidas de um sinal de *flicker* de 30 Hz da mesma intensidade luminosa e duração. As respostas foram amplificadas (filtragem: 0,3-300 Hz) e armazenadas para análise off-line usando o *Espion E³* (Diagnosys LLC, Lowell, MA) após média de 6-40 medições individuais em cada step dependendo da relação sinal / ruído.

Como descrito por outros autores, a razão da amplitude das ondas a e b (Razão B/A) é frequentemente usada como um indicador da integridade funcional da retina externa e interna, bem como para identificar provável local da lesão (LAWWILL *et al.*, 1972; EVANS *et al.*, 1993; MANNA *et al.*, 2016). Dessa forma a Razão B/A foi obtida para cada intervalo de tempo analisado e para os dois grupos de tratamento, com e sem fármaco. Os valores médios foram então comparados com a média obtida para os animais antes da administração dos implantes.

O aumento da amplitude da onda-b no ERG em animais adaptados ao escuro em razão do aumento do estímulo luminoso é descrito pela equação de Naka-Rushton:

$$V/V_{\text{máx}} = I^n / (I^n + K^n) \quad (\text{equação 4})$$

Onde **V** é a amplitude da onda-b para uma determinada intensidade de estímulo luminoso (**I**), que é determinada por três parâmetros: amplitude máxima da onda-b (**V_{máx}**); **K** (log cd.s/m²), que é a intensidade de luz necessária para que a onda-b alcance metade de **V_{máx}** ou constante de semissaturação que representa a sensibilidade da retina externa ao estímulo luminoso, e um expoente **n** que determina a inclinação da porção linear da função, ou seja, é a inclinação quando **I** é igual a **K** (LAWWILL *et al.*, 1972; EVANS *et al.*, 1993; MANNA *et al.*, 2016).

1.7 Avaliação histológica

Após a realização do último ERG os animais foram eutanasiados com sobredose letal de pentobarbital por via venosa (veia marginal da orelha esquerda). O olho foi removido e

colocado em um frasco de 50 mL contendo solução de Davidson, para fixação. A solução foi preparada de acordo com o **Quadro 7**.

Quadro 7 – Constituição da solução de Davidson utilizada para fixação histológica

Componente	Quantidade
Ácido Acético Glacial	100 mL
Formalina Tamponada 10%	200 mL
Álcool etílico 95%	300 mL
Água Destilada	300 mL

Durante o processamento os olhos foram mantidos em recipiente fechado, para garantir o teor de etanol em cada etapa. Na etapa de diafanização, observou-se que os olhos ficaram com aspecto transparente, conforme esperado devido à ação do xilol. Após o emblocamento com parafina os blocos foram mantidos na temperatura de -20°C até o momento do corte.

As lâminas dos olhos controle e tratado com os implantes foram montadas utilizando bálsamo do Canadá e lamínula. Em seguida, elas foram analisadas em microscópio óptico de luz branca, para avaliação de sinais de irritação ou inflamação, como edema, neovascularização, presença de células inflamatórias ou outra anormalidade.

1.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico R (versão 3.4.2) e Prism (versão 5) (GraphPad Software, Califórnia, EUA). As diferenças nos parâmetros do ERG (amplitudes e tempos implícitos) entre os grupos ao longo do tempo foram testadas para distribuição normal (teste de normalidade de Shapiro-Wilk) antes das análises de comparação múltipla por ANOVA (dados paramétricos) com post hoc de Tukey ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) com Nemenyi post hoc. O teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos) e o teste *t* (dados paramétricos) foram adotados para análises de comparação única. O teste *t* foi usado para comparar a PIO. Para todos os testes, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

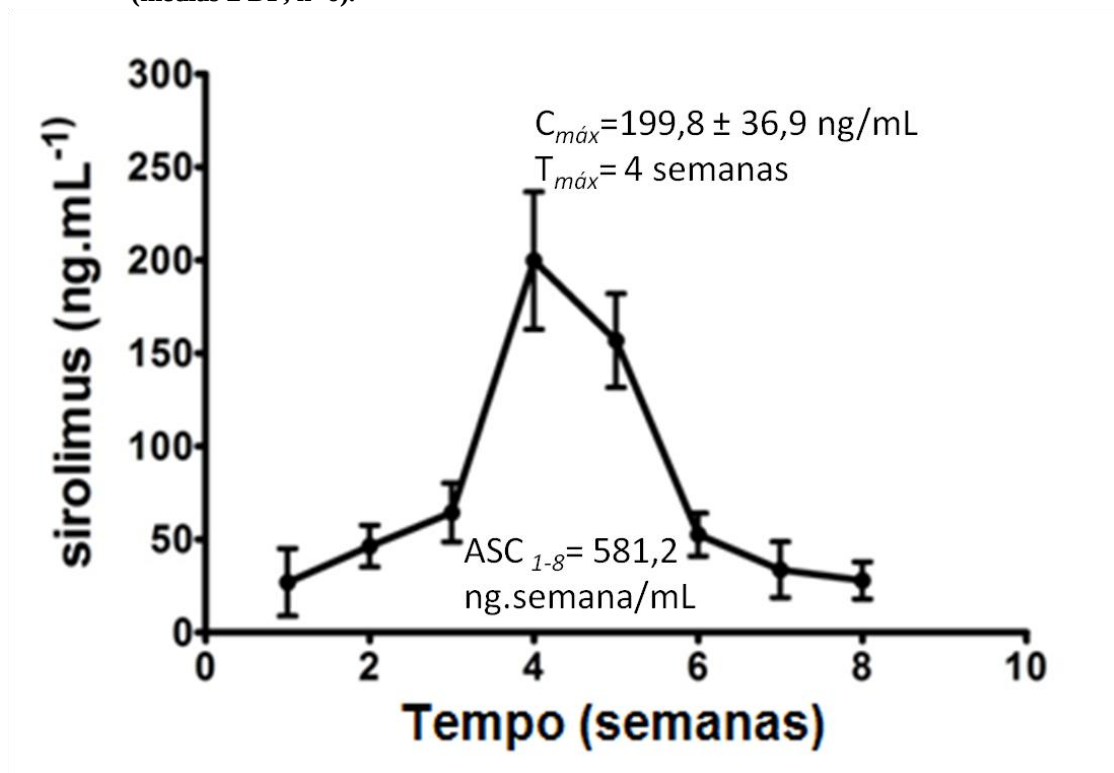
2.1 Perfil de liberação

Formulações de liberação prolongada, quando administradas diretamente no olho, têm como objetivo manter a concentração do fármaco, em índice terapêutico por períodos prolongados, permitindo assim, intervalos maiores de administração, com maior conforto para o paciente. Para isso, a avaliação do tempo de permanência do fármaco e de seus efeitos no segmento posterior do olho torna-se necessária.

Por ser uma abordagem invasiva, eticamente restrita e poder influenciar nos resultados dos estudos de farmacocinética, o olho humano é raramente utilizado para esse tipo de estudo. De um modo geral, com base nos dados da literatura recente, o coelho é um modelo comumente utilizado e clinicamente previsível para estudos de farmacocinética após administração de um fármaco por via intravítrea, uma vez que tanto o volume de distribuição intravítrea como os valores de depuração diferem apenas moderadamente entre o coelho e o ser humano (DEL AMO, *et al.*, 2017). Comparando os estudos realizados por (DEL AMO *et al.*, 2015) sobre a farmacocinética após administração intravítrea em coelhos e em humanos não foram evidenciadas diferenças nos principais parâmetros farmacocinéticos analisados (*clearance* e volume de distribuição).

Neste estudo, portanto, a farmacocinética foi determinada em olhos de coelhos. A **Figura 14** apresenta a concentração média de SRL liberada a partir de implantes biodegradáveis de PLGA no humor vítreo de coelhos durante 8 semanas. A análise do perfil farmacocinético mostra uma liberação prolongada do SRL por até oito semanas após a administração do implante. Os parâmetros farmacocinéticos concentração máxima ($C_{máx}$), tempo máximo ($T_{máx}$) e área sob a curva (ASC) foram determinados a partir da análise dos dados plotados na **Figura 14**. A C_{max} do SRL liberada pelo implante ($199,8 \pm 36,9$ ng/mL) ocorreu em quatro semanas.

Figura 14 - Concentração de SRL liberada a partir dos implantes inseridos na cavidade vítrea de olhos de coelhos durante oito semanas (médias $\pm$ DP, n=6).



Tendo em vista os sistemas atualmente disponíveis e estudados para a liberação prolongada de SRL, que demonstraram liberação constante do fármaco em concentrações inferiores a 5,2 ng/mL (LANCE *et al.*, 2015), o presente trabalho apresenta uma alternativa promissora para a liberação intravítrea do fármaco por até 8 semanas. O implante de SRL-PLGA apresentou uma liberação sustentada durante as primeiras 4 semanas. Neste ponto, um *burst* de liberação foi observado provavelmente devido às características da matriz polimérica. Para os sistemas à base de PLGA, observa-se geralmente uma difusão inicial do fármaco através de poros e canais; e então, um *burst* de liberação é observado devido à degradação da matriz polimérica que facilita a liberação do fármaco. Este perfil de liberação também foi observado em trabalhos anteriores do nosso grupo (FIALHO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2014; FERNANDES-CUNHA *et al.*, 2015). Embora a concentração de SRL necessária para o controle da uveíte ainda seja desconhecida, um perfil de liberação sustentada é desejável, uma vez que mantém os níveis de fármaco intravítreo constantes por um período prolongado.

A degradação do PLGA *in vivo* pode ocorrer por erosão e por clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando os ácidos lático e glicólico. Estes ácidos são metabólitos naturais do corpo que são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de dióxido de carbono e água. A biocompatibilidade de implantes de PLGA intravítreo é amplamente descrita na literatura,

apesar do caráter ácido de seus produtos de degradação (FIALHO; CUNHA, 2007; SOUZA *et al.*, 2014). O tempo (meses) de degradação aproximada do PLGA 75:25, polímero utilizado neste estudo, é de 2 a 4 meses. Quanto maior a proporção de ácido lático, maior a hidrofobicidade do copolímero, uma vez que absorve menos água e leva a uma menor taxa de degradação (FIALHO *et al.*, 2003; KUNO; FUJII, 2011; KANG-MIELER *et al.*, 2014).

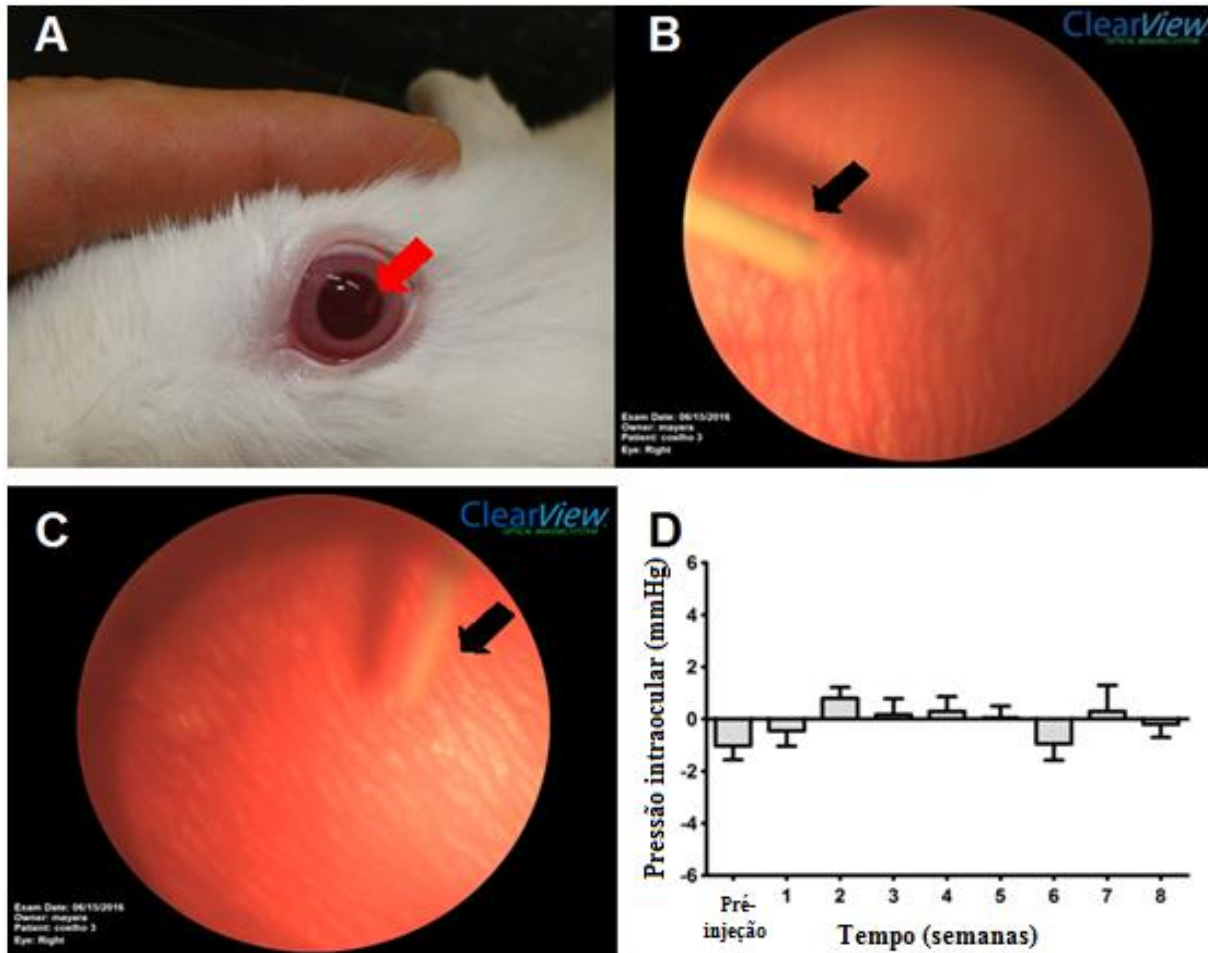
Em 2009, o FDA aprovou o implante biodegradável para administração de dexametasona no segmento posterior do olho, Ozurdex[®] (Allergan, Inc, Irvine, CA), usado para tratar o edema macular associado à oclusão da veia da retina. Este sistema é uma forma cilíndrica baseada em PLGA e fornece concentração terapêutica de dexametasona durante 6 meses (HALLER *et al.*, 2011; KLAMANN *et al.*, 2017). O implante desenvolvido neste trabalho se assemelha ao Ozurdex[®] tanto em sua forma, quanto ao seu perfil de liberação.

2.2 Avaliação clínica

A **Figura 15** mostra imagens do implante SRL-PLGA na cavidade vítrea imediatamente após a administração (**Figura 15A**), após 3 (**Figura 15B**) e 6 semanas (**Figura 15C**). Como pode ser observado, os implantes se encontram próximo ao local onde foram inseridos causando, o que demonstra ausência ou apenas discreta mobilidade dos implantes na cavidade vítrea. Observou-se que o implante mudou de formato e ficou mais curto e mais fino durante o estudo (**Figura 15C**). Analisando as **Figura 15B e C**, podemos observar a ausência de inflamação, hemorragia e sinais clínicos macroscópicos de toxicidade retiniana.

A análise dos dados plotados na **Figura 15D** mostra que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a PIO antes da inserção dos implantes e nem durante as oito semanas de estudo ($17,7 \pm 1,8$ e $17,2 \pm 1,2$ mmHg, respectivamente). De acordo com Zou e colaboradores (2011) a PIO é um importante parâmetro para avaliação da biocompatibilidade do sistema, pois uma alteração significativa da mesma pode ser, por exemplo, resultado de um processo inflamatório.

Figura 15- Fotografias mostrando o implante no vítreo imediatamente após a inserção (A), fundo de olho na terceira semana (B) e na sexta semana (C) após administração de implantes. Valores de pressão intra-ocular (PIO) após implante do dispositivo SRL-PLGA (D) ($p < 0,05$; $n = 4 \pm SD$). As setas destacam o implante de SRL-PLGA



No estudo *in vivo* realizado não foi observado nenhum caso de opacidade corneana, hemorragia vítrea, neovascularização, descolamento de retina e atrofia do nervo óptico nos olhos que receberam os implantes durante o acompanhamento clínico, 8 semanas após a inserção. Cabe destacar que em nosso estudo não foi observado movimentação do implante, o que poderia ocasionar comprometimento da visão. É de fundamental importância avaliar se o mesmo comportamento ocorre em olhos acometidos por uveíte, onde o vítreo pode apresentar perda de viscosidade devido ao processo inflamatório.

Durante as oito semanas de avaliação foram observadas apenas alterações discretas no olho de dois animais, demonstrando que o implante foi bem tolerado pelos olhos de coelhos saudáveis. Em um olho do grupo que recebeu o implante de SRL-PLGA foi observada hiperemia moderada, arrasamento da câmara anterior, secreção mucopurulenta leve e hemorragia discreta na íris com resolução espontânea após duas semanas. Outro olho que

também recebeu o implante contendo o fármaco apresentou hiperemia da conjuntiva e secreção discreta na terceira semana sem outros sinais oculares importantes. Nenhum destes animais foi removido do estudo, pois provavelmente estas alterações ocorreram devido ao processo de administração dos implantes, uma vez que não foram observadas alterações significativas na oftalmoscopia indireta durante todo o tempo de estudo.

2.3 Estudo funcional da retina por eletrorretinograma de campo total (ERG)

A avaliação da toxicidade causada pela administração de SRL a partir de um dispositivo de liberação prolongada é crucial para seu uso seguro. A segurança de vários dispositivos de administração intravítrea de fármacos tem sido avaliada utilizando eletrorretinografia (ERG), pois os parâmetros obtido por este exame podem ser combinados de diferentes maneiras, a partir dos quais é possível obter informações complementares da função das camadas de células da retina. Existem relatos na literatura de estudos que avaliaram a segurança e biocompatibilidade de sistemas de liberação de fármacos lipofílicos usando ERG, tais como ciclosporina, dexametasona, triamcinolona, 2-metoxiestradiol e talidomida (ROBINSON *et al.*, 2002; FIALHO *et al.*, 2006, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012; ALMEIDA, *et al.*, 2015). Não existem relatos na literatura da avaliação da toxicidade de implantes de liberação prolongada SRL-PLGA usando uma técnica não invasiva como a ERG.

O estudo funcional da retina e a pesquisa por possíveis alterações decorrentes da inserção dos implantes com e sem SRL foi realizado por ERG antes e após 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas de implantação. As variáveis analisadas foram a amplitude e tempo implícito da onda-a e da onda-b (AAmp, AImp, BAmp e BImp, respectivamente) nas condições escotópicas (0,01; 3,0 e 10 cd.s/m²), fotópica e *flicker*. Também foram analisadas a relação amplitude onda-b/ amplitude onda-a na condição escotópica.

Quando adaptado ao escuro, o ERG gera uma onda-a que é obtida principalmente a partir da resposta combinada máxima e reflete a função dos fotorreceptores. Fisiologicamente, a onda-a corresponde à hiperpolarização dos fotorreceptores devido ao fechamento dos canais de sódio ao longo da membrana plasmática do segmento externo e o sinal processado pelo ERG se apresenta como uma deflexão negativa, seguida por uma onda positiva, a onda-b, que resulta do fluxo de corrente ao longo das células de Müller em resposta a concentrações aumentadas de íons de potássio extracelular. Esse processo é altamente dependente das células bipolares dentro da camada nuclear interna. Além disso, podem ser observados potenciais oscilatórios

(POs) que ainda não possuem origens bem definidas, mas é essencial considerar sua presença ou ausência, bem como a sua morfologia (RONG *et al.*, 2014).

Para avaliar o impacto do implante intravítreo de SRL-PLGA na função retiniana, a amplitude de ondas a e b ou respostas de tempo implícitas em condições de luz e escuro foram analisadas separadamente, de acordo com as recomendações da ISCEV. No primeiro momento, foi observada a resposta aos estímulos luminosos em animais adaptados ao escuro. Na intensidade luminosa de 0,01 cd.s/m² desencadeia a resposta de bastonetes advinda das células bipolares gerando uma onda positiva (onda b), com o aumento da intensidade luminosa para 3 cd.s/m² obtém-se a resposta combinada das células fotorreceptoras, cones e bastonetes, que corresponde a uma onda negativa (onda-a), seguida pela excitação das células bipolares originando uma onda positiva (onda-b), com o estímulo de 10 cd.s/m² é possível observar um aumento da onda-a, reflexo da atividade dos fotorreceptores, como mostrado na **Tabela 6**. A medida da amplitude dessas ondas e do tempo implícito nos diferentes estímulos luminosos é um indicativo da integridade dessas células. Em seguida, a resposta dos cones ao flash único (3,0 cd.s/m²) e *flicker* 30 de Hz foi analisado em animais adaptados à luz, conforme mostrado na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Amplitude (μV) e tempos implícitos (ms) de animais adaptados a luz no início do estudo (controle), 24 h, 1s (1 semana), 4s (4 semanas), 6s (6 semanas) e 8s (8 semanas) após a administração dos implantes PLGA (tabela superior) ou SRL-PLGA (tabela inferior) em comparação com o olho controle não tratado (esquerdo) ($n = 4$) ($p < 0,05$)

PLGA									
	Pré-injeção	24 h	Olho controle	1 s	Olho controle	4 s	Olho controle	6 s	Olho controle
BAmp (3.0 cd.s/m²)^a	62,5 ± 9,5	82,6 ± 15,1	61,7 ± 5,2	104,8 ^a ± 22,1	65,3 ± 5,3	90,9 ± 35,5	66,4 ± 6,0	67,0 ± 14,7	83,0 ± 14,5
Tempo implícito^b	32,5 ± 1,3	30,3 ± 1,0	33,0 ± 1,1	29,8 ^a ± 1,5	35,1 ± 1,5	28,0 ± 1,4	33,1 ± 3,1	31,5 ± 2,4	30,0 ± 0,0
30 Hz Flicker^c	23,10 ± 3,9	24,4 ± 3,0	29,0 ± 0,4	35,2 ^a ± 6,7	33,8 ± 0,3	34,5 ± 12,5	36,0 ± 1,5	33,0 ± 9,2	34,8 ^a ± 3,2
Tempo implícito[*]	36,5 ± 1,3	31,8 ^a ± 4,6	31,8 ± 2,3	35,5 ± 0,6	35,5 ± 0,3	32,0 ± 4,7	32,0 ± 2,3	32,8 ± 5,2	35,8 ± 1,0
SRL-PLGA									
	Pré-injeção	24 h	Olho controle	1 s	Olho controle	4 s	Olho controle	6 s	Olho controle
BAmpCone ERG (3.0)	62,1 ± 4,0	62,2 ± 15,4	61,4 ± 4,7	74,7 ± 22,2	62,6 ± 6,6	89,7 ± 17,3	69,2 ± 15,0	68,5 ± 9,4	51,8 ± 13,2
Tempo implícito^b	33,1 ± 2,0	30,8 ± 3,0	39,7 ± 3,2	30,0 ± 2,2	31,8 ± 4,2	28,0 ^b ± 1,4	32,2 ± 4,1	32,0 ± 2,3	29,5 ^b ± 1,7
30 Hz Flicker^c	25,4 ± 3,3	26,3 ± 7,8	30,8 ± 1,1	30,8 ± 11,6	30,5 ± 1,3	43,9 ± 18,8	31,8 ± 2,3	32,4 ± 3,1	33,3 ± 10,8
Tempo implícito[*]	35,0 ± 6,9	31,3 ± 4,3	32,0 ± 2,4	32,0 ± 7,5	35,5 ± 1,2	30,0 ± 5,6	31,5 ± 2,5	31,0 ± 4,5	28,3 ^b ± 3,8

^a – diferença significativa comparando Pré-injeção e implante de PLGA

^b – diferença significativa comparando Pré-injeção e implante de SRL-PLGA

^A – diferença significativa comparando implante de PLGA e olho controle

^B – diferença significativa comparando PLGA e SRL-PLGA

^C – diferença significativa comparando SRL-PLGA e olho controle

*: Kruskal Wallis (dados não paramétricos) com Nemenyi post-hoc

▪: ANOVA (dados paramétricos) com Tukey post-hoc

De acordo com as respostas ERG adaptadas ao escuro, após 4 semanas de administração de implantes, observamos um pequeno aumento, menor que 30%, mas estatisticamente significativo, nas respostas de dois animais que receberam os implantes de SRL-PLGA quando comparado ao controle. No entanto, essas alterações foram transitórias, sem relevância clínica e após 6 semanas não foram observadas diferenças significativas. Supomos que esse aumento tenha sido momentâneo e relacionado ao *burst* de liberação do fármaco naquele momento, o que não causou nenhum dano permanente para os olhos desses animais, uma vez que a análise após esse período mostrou que os parâmetros do ERG retornaram aos valores normais. A **Figura 16** apresenta exemplos de respostas escóticas obtidas do ERG antes e após 24h, 1, 4, 6 e 8 semanas da inserção do implante, com emprego de intensidades luminosas variando de 0,01; 3,0 e 10,0 cd.s/m². A resposta obtida a partir dos olhos que receberam o implante de PLGA está representada como linha cinza contínua, implantes SRL-PLGA como linha cinza pontilhada e olhos controles como linha preta.

A **Figura 17** apresenta os gráficos de ERG correspondentes as respostas fotópicas obtidas antes e após 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas da inserção do implante para as intensidades luminosas de 3,0 cd.s/m² (**Figura 17A**) e *flicker* (**Figura 17B**). As respostas obtidas para os animais que receberam o dispositivo contendo o fármaco (linha cinza tracejada), não apresentaram diferença significativa quando comparado aos olhos que não receberam nenhuma intervenção (linha preta).

Quando adaptado à condição fotópica com um estímulo de luz branca único pode-se avaliar principalmente a função dos cones, apesar dos bastonetes apresentarem uma pequena participação. Para avaliação exclusiva da resposta de cones, adaptando-se à condição fotópica o paciente/animal pode ser submetido a flashes luminosos repetidos superiores a 25 Hz (usualmente 30 Hz), o que é chamado de *flicker* (DAMICO *et al.*, 2012; ODOM *et al.*, 2016).

Figura 16 - Gráficos representativos da resposta escotópica obtida do ERG após a administração de implantes de PLGA (linha cinza contínua), implantes SRL-PLGA (linha cinza tracejada) e olho de controle não tratado (linha preta) antes e após 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas da inserção dos implantes.

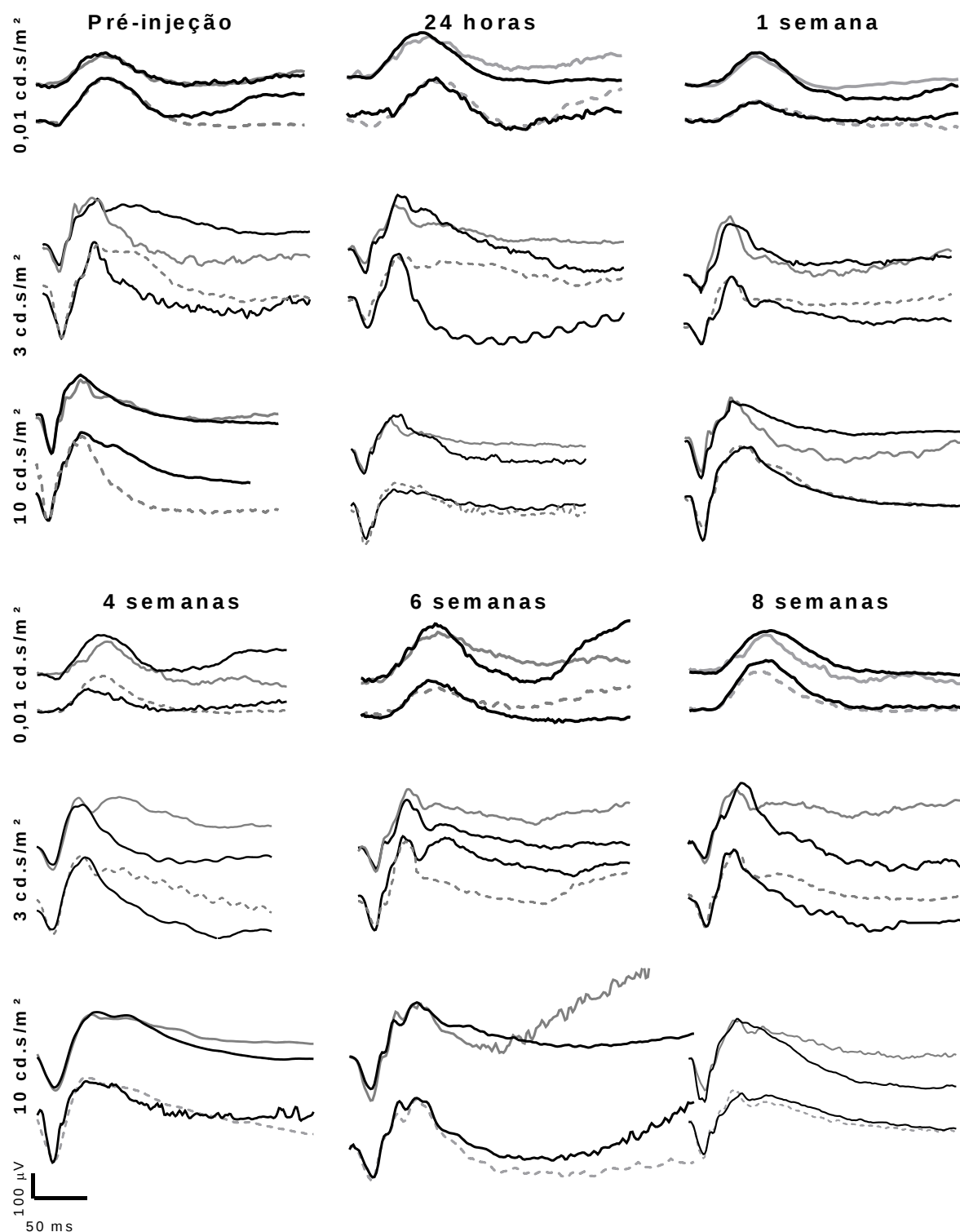
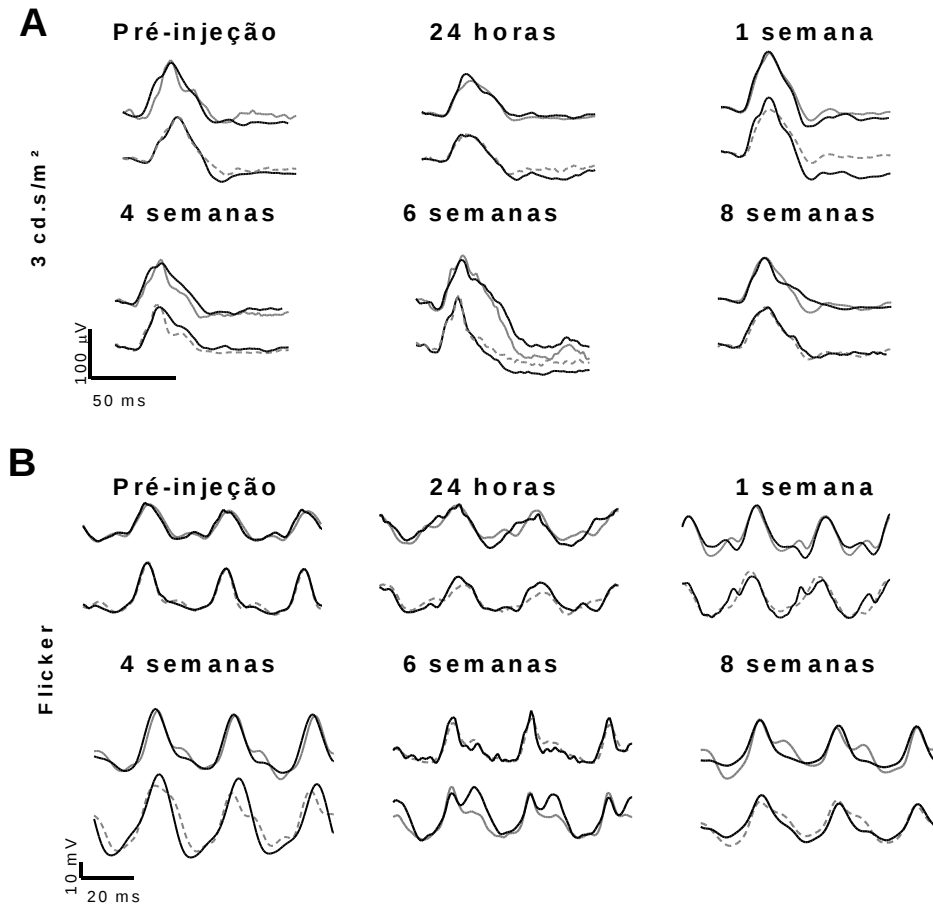


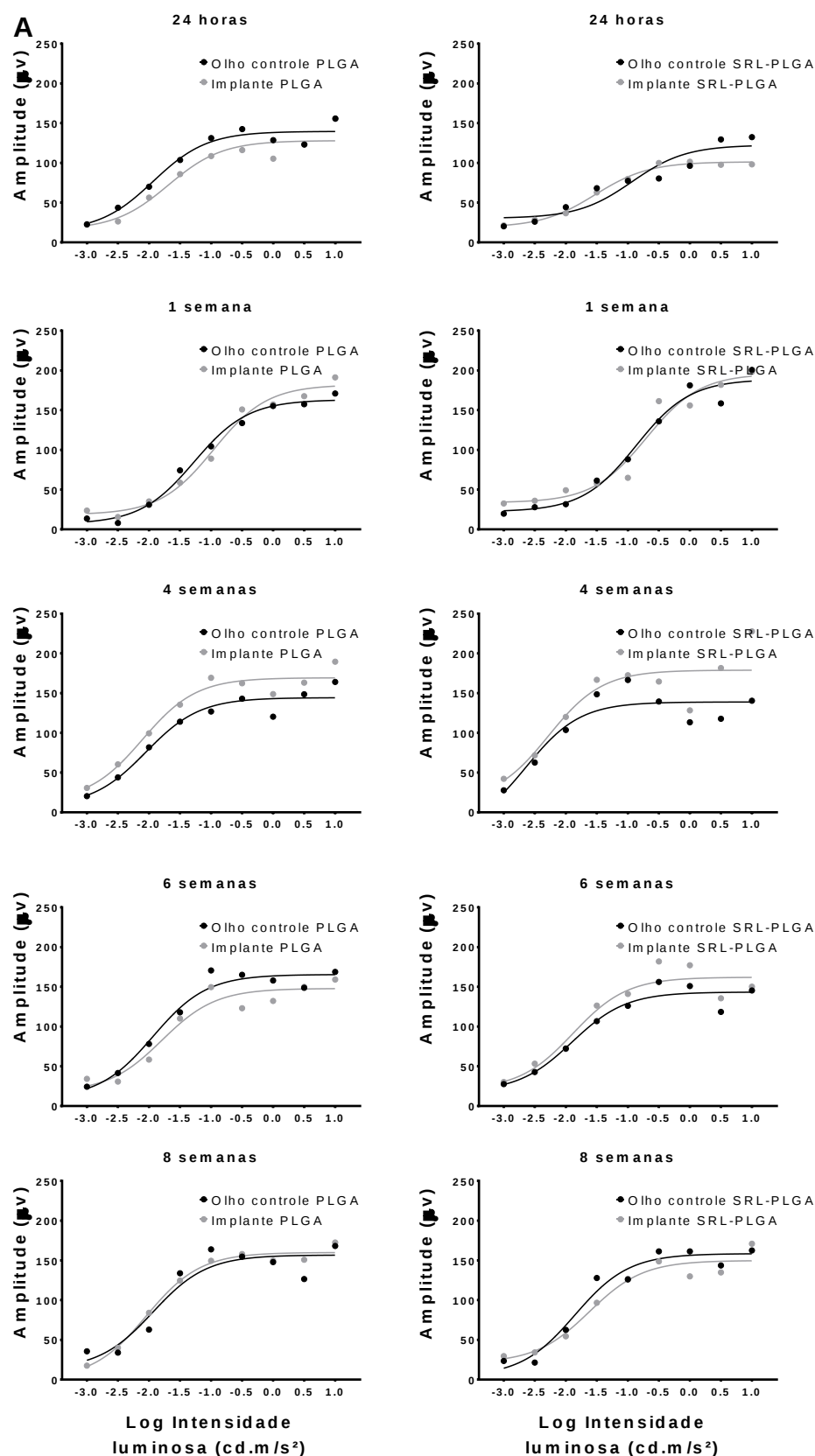
Figura 17 - Gráficos correspondentes às respostas fotópicas obtida do ERG após a administração de implantes de PLGA (linha cinza contínua), implantes SRL-PLGA (linha cinza tracejada) e olho de controle não tratado (linha preta) antes e após 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas da inserção dos implantes.



A amplitude média da onda-b dos animais adaptados ao escuro foi analisada em função do logaritmo da intensidade luminosa usando a equação de Naka-Rushton. Na **Figura 18** são apresentadas curvas referentes aos animais após administração de implantes de PLGA (coluna esquerda) ou SRL-PLGA (coluna direita) e os respectivos olhos controle, nos intervalos de 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas. A partir equação de Naka-Rushton foram obtidos os parâmetros de saturação média da onda-b ($V_{\text{máx}}$) e logaritmo da constante de semi-saturação (k) em diferentes tempos na condição escotópica, estes resultados são mostrados na **Figura 19**. Os olhos que receberam implante de SRL-PLGA não apresentaram valores diferentes do olho contralateral controle para esses parâmetros durante o período avaliado. O mesmo foi observado para os animais que receberam o implante de PLGA.

A correlação entre as amplitudes da onda-a e onda-b sob condição escotópica e intensidade luminosa de 30 cd.s/m^2 foi avaliada para o grupo que recebeu o implante de PLGA e aquele que recebeu o implante de SRL-PLGA durante as oito semanas do estudo, esses dados são

Figura 18 - Curvas da amplitude da onda-b versus log da intensidade luminosa dos olhos de coelhos albinos após administração de implantes de PLGA (coluna esquerda) ou SRL-PLGA (coluna direita) e os respectivos olhos controle, nos intervalos de 24 horas, 1, 4, 6 e 8 semanas.



apresentados na **Figura 20**. Durante o período avaliado não foram observadas alterações significativas na razão BAmP/AAmP, o que nos permite sugerir a integridade funcional da retina externa após a inserção dos implantes. Como já descrito, a onda-a é decorrente da resposta dos fotorreceptores ao estímulo luminoso e a onda-b das células de Müller e das células bipolares, sendo que a razão BAmP/AAmP reflete a integridade funcional dessas células, bem como a transmissão de sinal entre elas. Uma alteração na razão BAmP/AAmP é característica de uma lesão nas células bipolares ou na transmissão sináptica. Já quando ocorre diminuição apenas na amplitude da onda-b devido a uma lesão nos fotorreceptores, a razão BAmP/AAmP permanece inalterada (DAMICO *et al.*, 2012; ODOM *et al.*, 2016).

Figura 19- Parâmetros obtidos a partir da equação de Naka-Rushton em diferentes tempos (adaptados ao escuro). Diferença de amplitude de saturação média da onda b ($V_{m\acute{a}x}$) (A). Diferença média do log da constante de semi-saturação (k) da onda b (B) ($p < 0,05$).

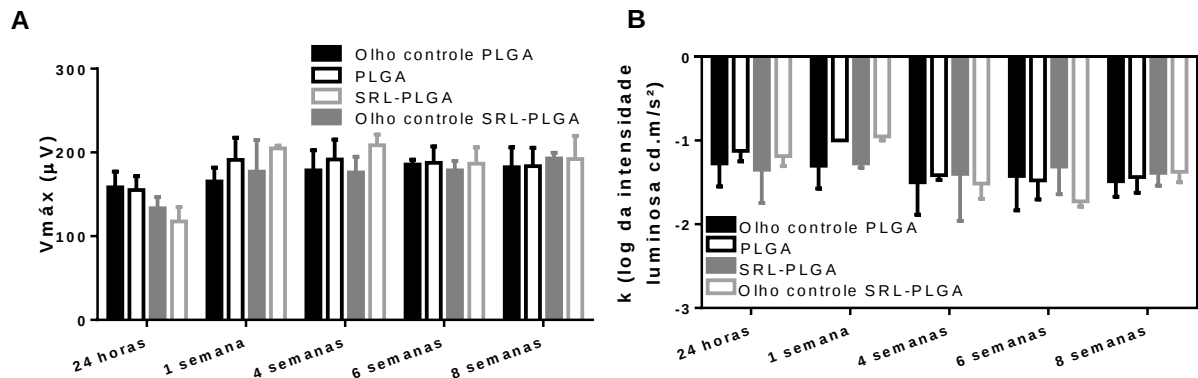
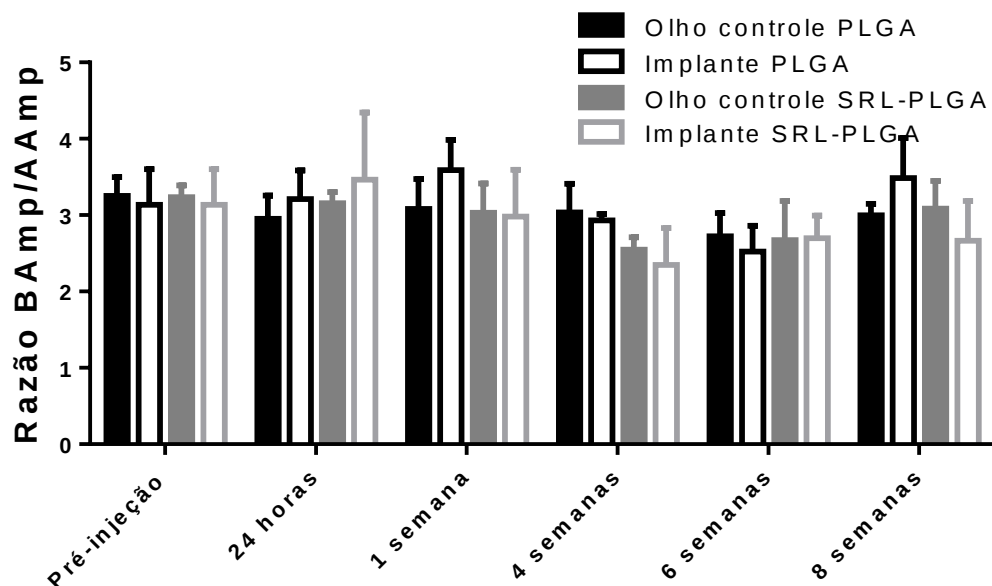


Figura 20 - Razão entre BAmP/AAmP em olhos que receberam o implante PLGA ou implante SRL-PLGA e o olho controle não tratado (esquerdo) em diferentes tempos (escotópico, estímulo de 30 cd.s/m²) ($p < 0,05$).



Os resultados do ERG sugerem que a administração intravítrea de implantes de SRL-PLGA não causaram alteração funcional permanente na retina de coelhos durante um período de 8 semanas de acompanhamento. Embora tenha sido encontrada diferença estatística significativa entre os implantes de PLGA e SRL-PLGA para as respostas escotópica e fotópica do ERG após a administração dos implantes desenvolvidos, estes foram inferiores a 30% para as amplitudes das ondas a e b, o que não é considerado clinicamente relevante (KIVILCIM *et al.*, 2007; PETERS *et al.*, 2017). Estas diferenças não foram persistentes e não causaram dano funcional irreversível à retina, pois nenhuma alteração significativa foi encontrada 8 semanas após a aplicação intravítrea dos implantes.

Além disso, não foi demonstrada diferença significativa nos parâmetros obtidos pela equação de Naka-Rushton ($V_{\text{máx}}$ e k) quando comparados os olhos controle com aqueles que receberam implantes PLGA ou SRL-PLGA. A razão Bamp/Aamp representa a integridade funcional para as células, a transmissão de sinal entre eles. Durante o período avaliado, não foram observadas diferença estatística significativa na razão média Bamp/Aamp, o que permite sugerir que a integridade funcional da retina externa após a inserção dos implantes foi mantida (DAMICO *et al.*, 2012; ODOM *et al.*, 2016). Este é um achado importante que confirma que não houve comprometimento funcional irreversível nos olhos dos coelhos avaliados.

Existem poucos estudos que analisaram a toxicidade do SRL intravítreo com emprego de ERG e os encontrados também demonstraram ausência de alterações nas estruturas oculares a partir da aplicação desses sistemas.

Douglas e colaboradores (2008), avaliaram a toxicidade e biodistribuição do SRL (5 ou 10 mg) após administração por via subconjuntival e intravítrea em cavalos. Os exames ERG foram realizados antes e após 1, 7, 14 e 21 dias após administração. Não foi evidenciada diferença estatística significativa para as amplitudes das ondas a e b.

Manzano e colaboradores (2009) avaliaram a toxicidade retiniana de SRL (20 µg, 50 µg, 200 µg e 1000 µg) em coelhos albinos. Segundo os autores, não foram observadas alterações clínicas ou histológicas nas concentrações avaliadas. No entanto, apenas a dosagem de 20 µg não apresentou redução da resposta escotópica.

Nieto e colaboradores (2015) avaliaram a toxicidade de micropartículas de sílica porosa contendo SRL administradas por injeção intravítrea em coelhos pigmentados por ERG. O

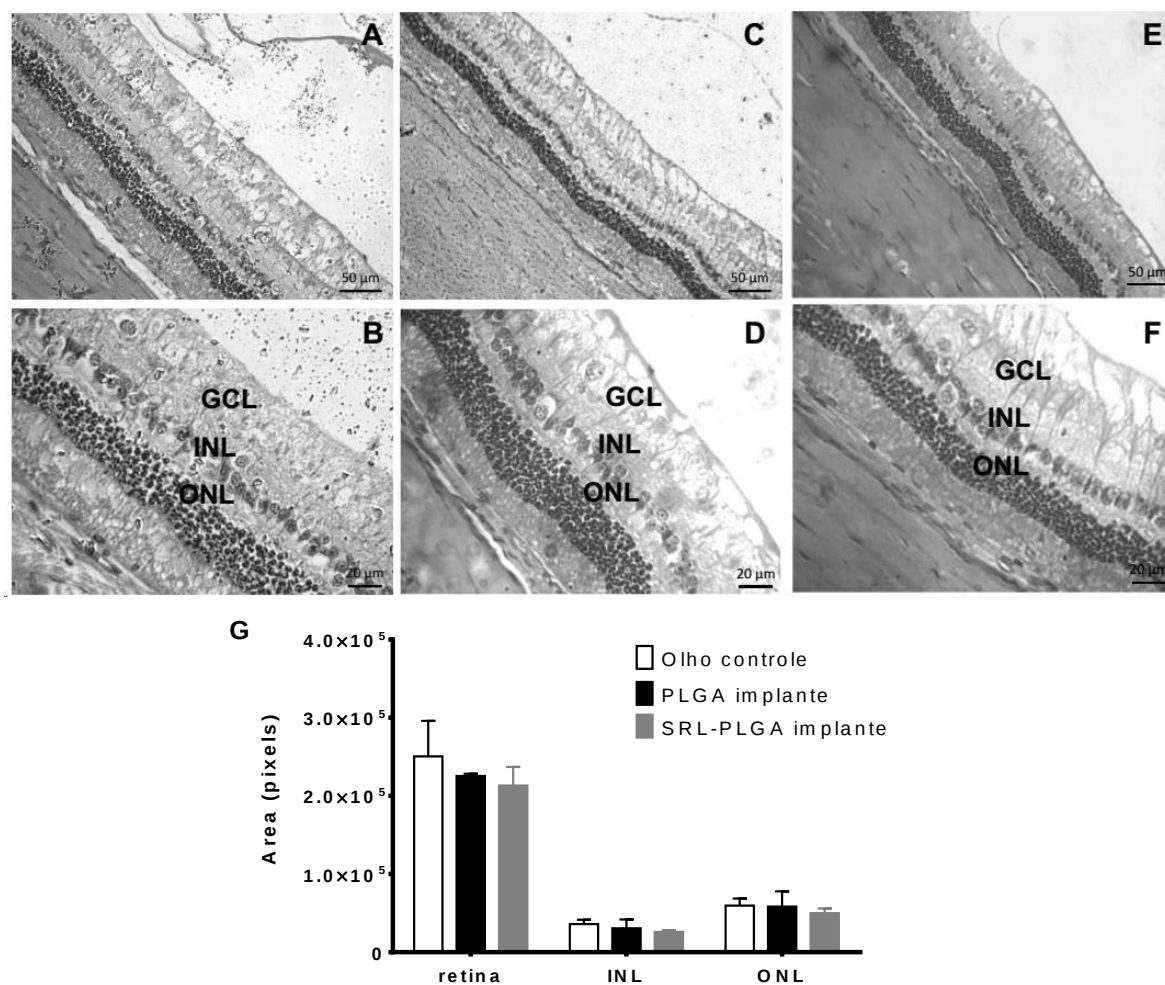
presente estudo demonstrou que a liberação prolongada de SRL no vítreo a partir do sistema desenvolvido não alterou a função retiniana.

2.4 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada comparando-se o olho que recebeu o implante de PLGA, SRL-PLGA com o olho que não recebeu nenhuma intervenção. Os cortes histológicos dos olhos que receberam os implantes de PLGA ou SRL-PLGA e aqueles que não receberam nenhum tratamento podem ser observados na **Figura 21**. Não foram evidenciados sinais de toxicidade retiniana ou infiltração de células inflamatórias. Consistente com os dados funcionais obtidos pelo ERG, nenhuma anormalidade estrutural foi observada, após 8 semanas, por microscopia de luz e a estrutura normal da retina foi preservada em olhos que receberam o implante intravítreo de SRL. A fim de confirmar a integridade estrutural da retina, as áreas das camada nuclear externa (ONL), camada nuclear interna (INL) e retina total foram medidas (**Figura 21G**). A média ($\pm$ DP) não apresentou diferença significativa entre os olhos que receberam implantes e aqueles que não receberam.

A retina dos olhos tratados com implantes PLGA e SRL-PLGA mostrou uma estrutura normal em camadas e semelhante à retina dos olhos de controle dos mesmos coelhos. Portanto, a ausência de células inflamatórias e a preservação de características histológicas podem confirmar a integridade da retina. A combinação da avaliação eletrofisiológica e histopatológica é uma ferramenta importante no estudo da toxicidade retiniana após administração intravítrea de fármacos.

Figura 21 - Fotomicrografias da retina de olhos de coelhos 8 semanas após a inserção do implante intravítreo de PLGA (C e D) ou SRL-PLGA (E e F) em comparação com o olho controle não tratado (esquerdo) olho (A e B). Gráfico de barras representa a média $\pm$ desvio padrão da área em pixels retina total da retina, da camada nuclear externa (ONL) e camada nuclear interna (INL) (G) (n=4). GCL - camada ganglionar.



3 CONCLUSÃO

Tendo em vista os sistemas de liberação atualmente disponíveis e estudados para a liberação prolongada de SRL, o presente trabalho apresenta uma alternativa promissora para a liberação intravítrea do fármaco por até 8 semanas.

Os resultados obtidos neste capítulo indicam que a administração intravítrea de implantes SRL-PLGA não causou alterações funcionais na retina dos coelhos, o que foi confirmado pelos achados clínicos da oftalmoscopia binocular indireta, exames eletroretinográficos e histologia durante 8 semanas de avaliação. A combinação de exame eletrofisiológico e avaliação histopatológica é uma ferramenta importante no estudo de toxicidade na retina após a administração intravítrea de um sistema de liberação de fármacos.

CAPÍTULO III:
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTI-INFLAMATÓRIA DOS
IMPLANTES DE SRL-PLGA EM MODELO DE UVEÍTE
EXPERIMENTAL

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Material

BCG (*Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*, Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil), Montanide ISA50 V2 (óleo mineral injetável, Seppic, França), Cloreto de sódio (Synth, Brasil), fosfato de sódio (Synth, Brasil), fosfato de sódio monobásico (Synth, Brasil), água ultrapura, cloridrato de cetamina (Dopalen[®], Ceva, Brasil), cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Ceva, Brasil), Tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália, Brasil), Cloridrato proximetacaína (Anestalcon[®] - Alcon, EUA).

1.2. Equipamentos

Sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Merck Millipore, EUA), balança analítica (Sartorius, Alemanha), agitador vórtex (IKA, Alemanha), lâmpada de fenda (Kowa SL 15, EUA), oftalmoscópio indireto (Heine Beta 200S, Heine, Alemanha), centrífuga (Thermo Fischer Scientific, Heraeus Multifuge X1R) e leitor de microplacas (Biotek, ELx800).

1.3. Animais

Foram utilizados 12 coelhos fêmeas, albinos, da raça Nova Zelândia, com peso entre 1,5 e 2,0 Kg, provenientes da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa. Os animais foram mantidos em pares nas gaiolas, em ambiente controlado com temperatura média de 25°C, ar condicionado, exaustor de ar e com ciclos de claro/escuro de 12 horas. Não houve restrição de água e a alimentação foi ração animal própria para a espécie. Os coelhos foram mantidos em quarentena durante 2 semanas antes do início do experimento. Ao final do experimento os coelhos foram eutanasiados com dose letal de tiopental sódico aplicado intravenoso na veia marginal da orelha dos animais. O estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Fundação Ezequiel Dias, protocolo n° 112/2017 (**Anexo IV**).

1.4. Indução da uveíte

A uveíte foi induzida em coelhos usando o protocolo modificado de Cheng *et al.* (1995). Inicialmente os animais foram pré-imunizados (Dia -14) com duas injeções (10 mg; 20 mg/mL) subcutâneas de BCG (*Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*, Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil) suspensa em 500 µL Montanide ISA50 V2 (óleo mineral injetável, Seppic, França) no dorso, com intervalo de 1 semana cada. O sucesso da

pré-imunização foi confirmado após uma semana das duas injeções (Dia 0) pela presença de um nódulo visível na pele no local da injeção (**Figura 22**). Os coelhos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 30mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, Brasil), 4,0 mg/Kg de Cloridrato de Xilasina (Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, Brasil), e instilação tópica de Cloridrato de Tetracaína 1% e Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio®, Allergan). Após 14 dias da primeira pré-imunização subcutânea, uma injeção intravítrea de BCG suspenso em solução salina estéril (50 µg; 1 µg/µL) foi administrada através da esclera temporal superior do olho direito usando uma seringa com uma agulha de calibre 30-gauge, a 4 mm do limbo. Após uma semana os animais receberam nova injeção intravítrea contendo BCG. Uma gota de solução oftálmica de tobramicina a 0,3% (Alcon Lab. USA) foi instilada no final do procedimento. O olho esquerdo foi utilizado como controle do experimento. A **Figura 23** mostra o fluxograma do desenho experimental do estudo.

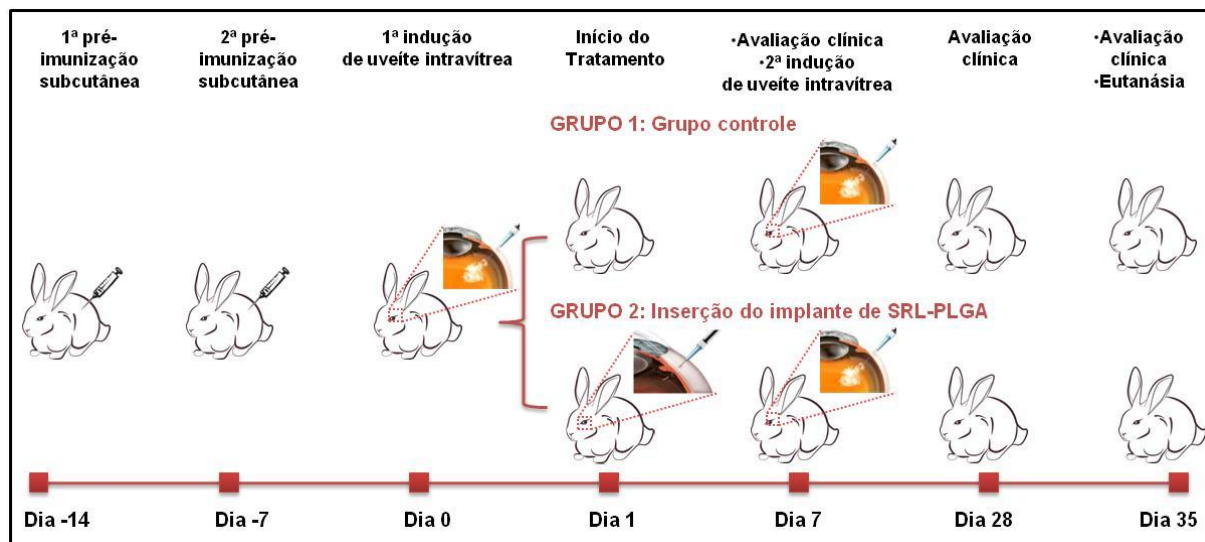
**Figura 22 - Nódulo visível no local da injeção
uma semana após a segunda pré-imunização**



1.5. Tratamento experimental da uveíte

No dia 1, os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de tratamento (n = 6 por grupo); o grupo 1 foi tratado após 1 dia da indução intravítrea da uveíte com implante SRL-PLGA no mesmo olho onde foi injetado o antígeno; o grupo 2 recebeu uma injeção de solução salina estéril, sendo o grupo de controle para o UAE e o olho esquerdo de todos os animais permaneceu sem intervenções sendo utilizado como controle do experimento. Os implantes de SRL-PLGA foram administrados por meio de um trocar de 25 G inserido através da *pars plana* do olho no quadrante temporal.

Figure 23 - Fluxograma para descrever o desenho do estudo. Todos os coelhos foram pré-imunizados com duas injeções subcutâneas do antígeno BCG nos dias -14 e -7. A uveíte foi induzida 1 dia antes do tratamento por uma injeção intravítrea unilateral do antígeno BCG. As observações clínicas foram realizadas nos dias 7, 28 e 35. Os coelhos foram eutanasiados no dia 35 para análises histológicas e marcadores inflamatórios.



1.6. Avaliação clínica

O *score* clínico da uveíte com e sem tratamento foi realizado por dois oftalmologistas de modo aleatório nos dias 7, 28 e 35, por biomicroscopia de lâmpada de fenda e oftalmoscopia binocular indireta. A gravidade clínica da uveíte foi classificada de 0 a 4, onde 0 indicou ausência de inflamação e 4 inflamação severa. Foram avaliados e graduados os seguintes parâmetros: hiperemia conjuntival, congestão de vasos na íris, presença de células, *flare*, membranas de fibrina, sinéquias e formação de catarata e *haze* (opacidade) vítreo, membranas inflamatórias, hiperemia do disco óptico, descolamento de retina e hemorragia retiniana no segmento posterior, como descrito na literatura (NUSSENBLAT *et al.*, 1985; THE STANDARDIZATION OF UVEITIS NOMENCLATURE (SUN) WORKING GROUP, 2005).

1.7. Avaliação histopatológica

A resposta inflamatória e a eficácia do tratamento foram avaliadas no final do experimento (após 35 dias) por análise histopatológica. A preparação do tecido foi realizada da mesma forma como descrito no **item 1.6 do Capítulo II**, a fim de avaliar a morfologia de tecidos oculares, presença de infiltrado de células inflamatórias e hemorragia.

1.8. Quantificação de proteínas no humor aquoso e humor vítreo

Com o objetivo de avaliar indiretamente a integridade das barreiras hemato-aquosa (BHA) e hemato-retiniana (BHR), importantes na progressão da uveíte, foi realizada a dosagem de proteínas no humor aquoso e humor vítreo de coelhos ao final do experimento conforme a metodologia proposta por Lowry *et al.* (1951). 50 µL de cada amostra foram transferidos para outro eppendorf devidamente identificado, adicionou-se 200 µL do reagente A (CuSO_4 , tartarato de sódio e Na_2CO_3 , na proporção de 1:1:100, respectivamente). Em seguida 25 µL do reagente B (Reagente de Folin diluído em água deionizada na proporção 1:2) foram colocados em cada eppendorf, seguidos de agitação em vórtex. Após trinta minutos de repouso à temperatura ambiente, 200 µL de cada amostra foi adicionado, em duplicata, em microplacas. A absorbância foi lida a 660 nm (Varioskan Flash, Thermo). Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da concentração de proteínas.

1.9. Análise de infiltrados celulares por quantificação das enzimas MPO e NAG

A avaliação do infiltrado inflamatório ocular consistiu na medida indireta da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetilglicosaminidase (NAG), presentes nos neutrófilos e macrófagos, respectivamente. O humor aquoso e humor vítreo coletados (50 µL de cada) foram homogeneizados com NaCl (0,2%, p/v) e depois adicionado NaCl a 1,6% gelado acrescido de 5% de glicose. As amostras foram rapidamente homogeneizadas, divididas igualmente nos ensaios NAG e MPO, e centrifugadas a 10.000 RPM (5000g) durante 10 minutos a 4°C. Depois de processar o humor aquoso e humor vítreo, o sobrenadante restante foi descartado.

A fim de avaliar a extensão do acúmulo de neutrófilos em humor vítreo e humor aquoso de coelho com uveíte tratados ou não com implante de SRL-PLGA, a atividade da MPO foi quantificada. Para o ensaio de MPO, metade do sedimento resultante de cada amostra foi ressuspenso em tampão Na_3PO_4 (0,05 M, pH 5,4) contendo 0,5% (p/v) de brometo de hexadeciltrimetilamônio, seguido de três ciclos de congelamento-descongelamento utilizando nitrogênio líquido e centrifugado a 10.000 RPM (5000g) por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi plaqueado em triplicata em placa de 96 poços. Após, foi adicionado substrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; 3,8 mg/mL diluído em DMSO) e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se H_2O_2 (0,002%, v/v) e as amostras foram novamente incubadas a 37°C durante 5 minutos. A incubação, a reação foi

interrompida pela adição de 100 μL de H_3SO_4 (1M). A leitura da absorbância foi a 450 nm. Os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos em cada triplicata para determinar a atividade da enzima.

A enzima lisossomal N-acetil-b-D-glicosaminidase (NAG) está presente em altos níveis em macrófagos ativados. Assim, para avaliar o infiltrado de células mononucleares no humor vítreo e humor aquoso de coelho com uveíte tratados ou não com implante de SRL-PLGA os níveis desta enzima foram medidos. Para quantificação indireta da atividade NAG em macrófagos, a outra metade do pellet inicialmente obtido foi homogeneizada em solução de NaCl (0,9%, p/v) com adição de Triton X-100 (0,1%, v/v; Sigma-Aldrich, Brasil) e centrifugada a 10.000 RPM (5000g) por 10 min a 4 °C. Os níveis de NAG foram quantificados utilizando um ensaio colorimétrico de acordo com as recomendações do fabricante (Kit de Ensaio de Atividade de p-N-acetilglucosaminidase, Sigma-Aldrich). O sobrenadante foi plaqueado em triplicata em placa de 96 poços e incubado durante 10 min com 100 μL de p-nitrofenil-N-acetil-b-glucosaminida (2,24 mM; Sigma-Aldrich, Brasil) preparado em tampão citrato/fosfato de sódio (0,1 M ácido cítrico, Na_2HPO_4 0,1 M, pH 4,5). Em seguida, foram adicionados 100 μL de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6) para interromper a reação e a hidrólise do substrato foi determinada medindo a absorbância usando um espectrofotômetro ajustado a 405 nm. A média dos valores obtidos em cada triplicata foi usada para determinar a atividade da enzima.

1.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em função da média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os dados foram avaliados através de análise de variância paramétrica One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Avaliação clínica da uveíte

A inflamação ocular é medida e graduada atualmente por exames clínicos utilizando biomicroscopia de lâmpada de fenda, oftalmoscopia binocular indireta e a escala SUN. Essa abordagem é considerada o padrão ouro para o diagnóstico clínico, em que a amostragem de tecidos oculares não pode ser facilmente obtida (EDMOND *et al.*, 2016).

O *score* inflamatório total, *score* do segmento anterior, células no segmento anterior e *haze* vítreo durante o período do estudo são apresentados na **Figura 24**. O *score* inflamatório total (**Figura 24A**) foi significativamente menor nos animais que receberam o tratamento SRL-PLGA implante nos dias 7, 28 e 35. Uma semana após o início do tratamento e logo antes de uma segunda indução intravítrea, que simula uma inflamação crônica com exacerbações (Dia 7), os animais tratados apresentaram redução significativa da resposta inflamatória (grupo controle UAE: 14,10 versus grupo tratamento: 7,42; $p= 0,0004$). Após 28 dias o grupo controle UAE apresentou *score* total de 15,10 e o grupo tratamento 8,33 ($p= 0,0004$). Ao final do experimento grupo controle UAE apresentou *score* total de 14,40 e o grupo tratamento 6,75 ($p< 0,0001$). Além disso, foi observado edema do disco óptico, densas membranas inflamatórias, hemorragia e descolamento de retina nos animais não tratados após 35 dias do início do tratamento.

A **Figura 24B** mostra a mudança nos *scores* inflamatórios do segmento anterior em relação à máxima inflamação que foi observada no dia 7, onde o grupo tratado apresentou diminuição significativa do *score* ($p= 0,0002$). Os sinais clínicos de inflamação no segmento anterior foram discretos em todos os animais após 28 e 35 dias da indução da uveíte, o que dificulta a observação de diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratamento utilizando lâmpada de fenda. No entanto, durante todo o experimento o *score* inflamatório do segmento anterior do grupo tratado foi menor do que 5,2; enquanto que para controle UAE esses valores foram superiores a 7,8. Assim como observado por outros autores utilizando metodologia semelhante, a inflamação ocorreu mais significativamente no segmento posterior do que no segmento anterior, provavelmente devido à administração do antígeno neste local (PAPANGKORN *et al.*, 2017).

O mesmo padrão foi observado para as células no segmento anterior (**Figura 24C**), onde após 7 dias da indução ocorreu o pico máximo da inflamação, com intensa presença de células na câmara anterior no grupo controle UAE (*score* superior a 3) e presença moderada de células para o grupo tratado (*score* inferior a 2) durante o período avaliado. Os resultados encontrados neste trabalho para a inflamação no segmento anterior são semelhantes aos descritos por Jaffe e colaboradores (1998) que avaliaram a eficácia dos implantes contendo ciclosporina usando um modelo de uveíte experimental semelhante ao deste estudo. No trabalho mencionado o pico da inflamação no segmento anterior acontece entre o primeiro e o terceiro dia após a primeira injeção do antígeno com posterior redução. Para simular a inflamação crônica os animais foram novamente desafiados com antígeno no dia 15.

O *haze* vítreo representa a turvação do humor vítreo observada na oftalmoscopia, que é resultante da presença de células inflamatórias, glóbulos vermelhos, proteínas e outras células que pode ocorrer durante o processo inflamatório, causando um grau variável de opacidade vítrea. No dia 7 os animais tratados apresentaram redução significativa do *haze* vítreo (grupo controle UAE: 2,9 versus grupo tratamento: 1,1; $p=0,0090$). Após 28 dias o grupo controle UAE apresentou *haze* de 3,2 e o grupo tratamento 2,0 ($p=0,0013$). Após 35 dias da indução da uveíte três dos seis animais tratados apresentaram *haze* vítreo leve, com *score* inferior a 0,9; significativamente menor do que o grupo controle UAE, onde todos os animais apresentaram *haze* vítreo intenso (*score* médio $\geq 2,6$) (**Figura 24D**). A opacidade no vítreo é um importante achado no exame oftalmológico que contribui na avaliação da gravidade da doença. Assim como descrito em outros trabalhos na literatura, o vítreo permaneceu opaco em todos os olhos não tratados até o final do experimento, enquanto que nos olhos que receberam tratamento essa opacidade foi diminuída (CHENG *et al.*, 1995; PAPANGKORN *et al.*, 2017)

As fotografias obtidas com a lâmpada de fenda estão dispostas na **Figura 25**. Pode-se observar que o grupo controle UAE apresenta uma congestão iriana e hiperemia conjuntival mais intensa, células na câmara anterior e *flare* quando comparado aos animais tratados com implante de SRL-PLGA. Além disso, é possível observar sinéquia (asterisco vermelho) no grupo não tratado.

Figura 24 - Resposta clínica dos animais com uveíte ao tratamento com o implante de SRL-PLGA comparado aos animais não tratados. Os valores representam os *score* clínico total (A); *score* segmento anterior (B); células no segmento anterior (C) e *score* do *haze* vítreo (D) após 7, 28 e 35 dias da indução da uveíte. Barras de erro representam média±SD. (n=4) * p<0,05.

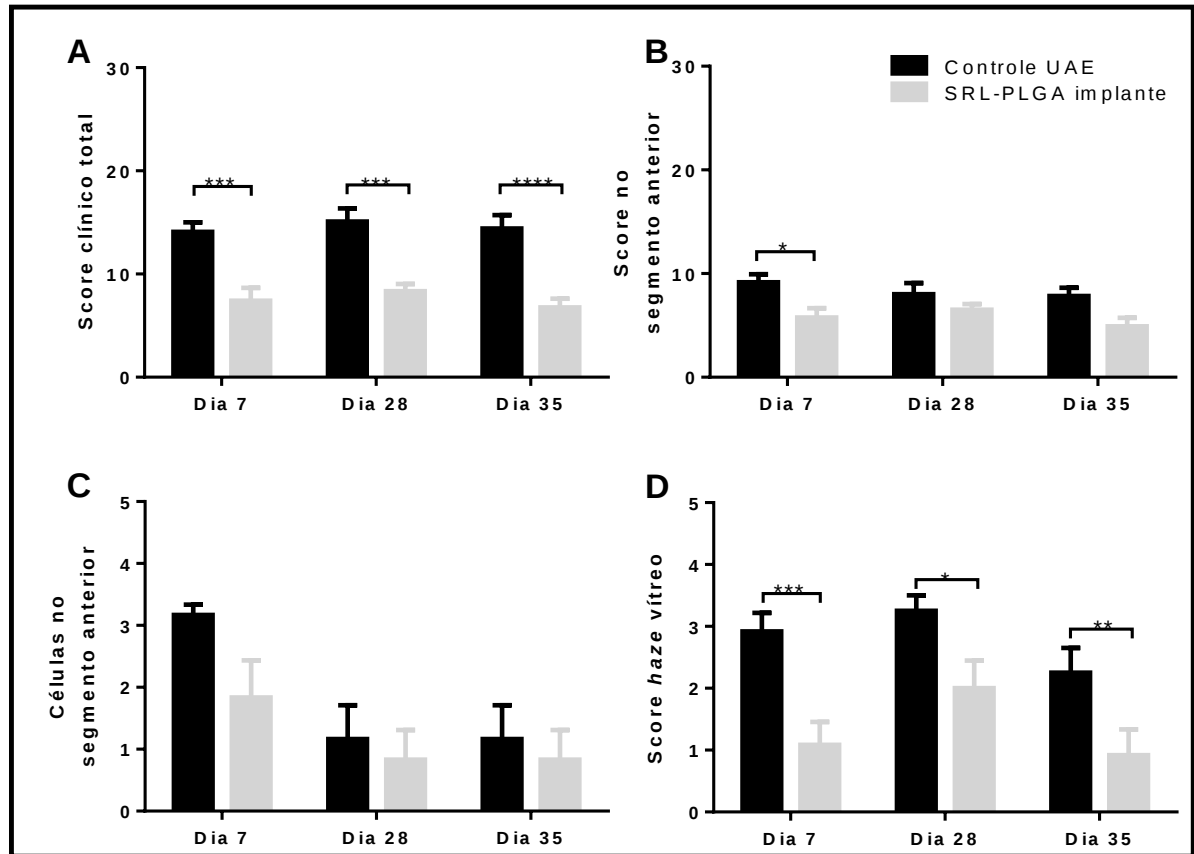
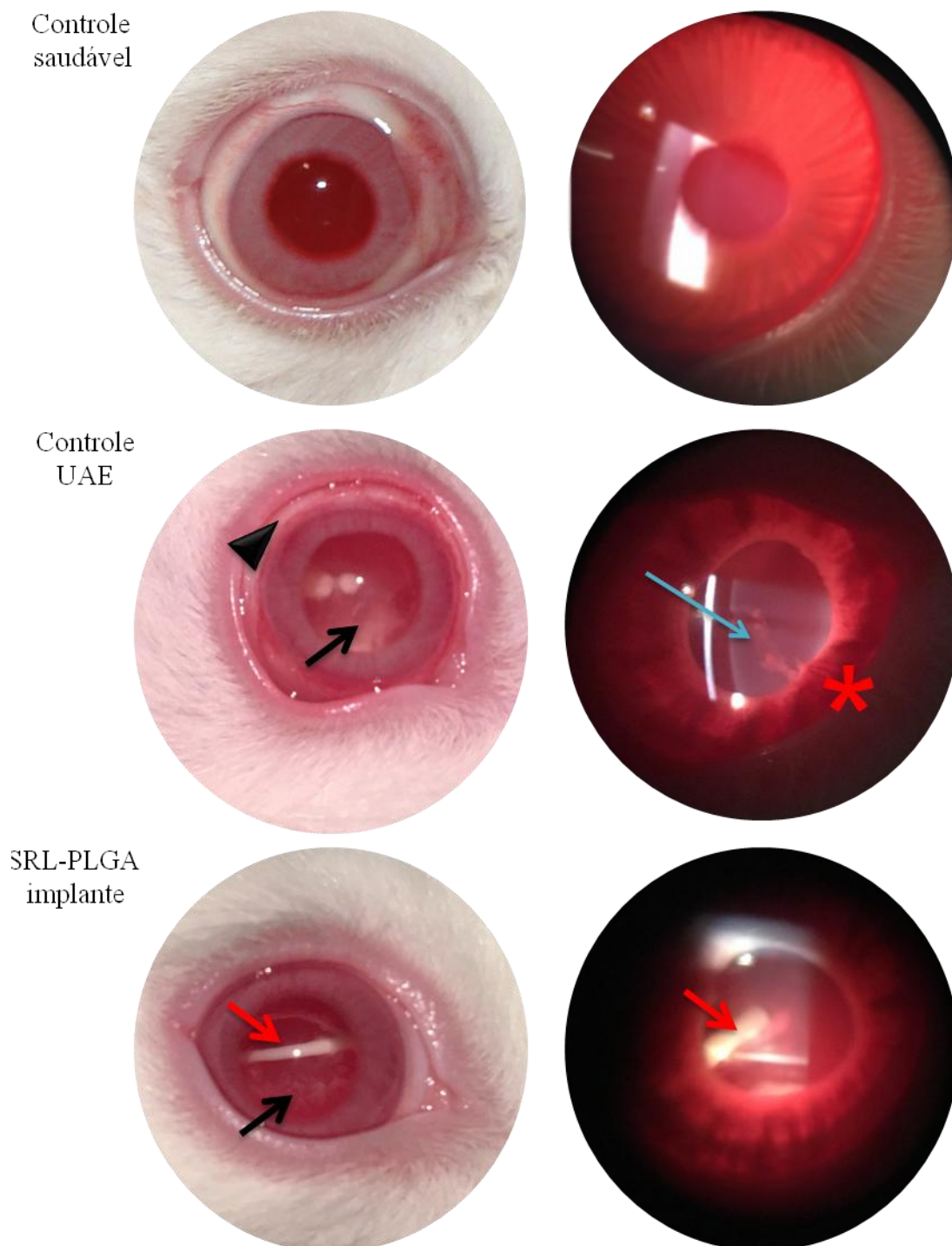


Figura 25 - Fotografias representativas de animais saudáveis, não-tratados (Controle UAE) e tratados com implante de SRL-PLGA após 35 dias da indução da uveíte. Setas pretas: flare e células na câmara anterior; ponta de seta preta: hiperemia conjuntival; seta vermelha: implante de SRL-PLGA, seta azul: precipitados inflamatórios; asterisco: sinéquia.



2.2 Avaliação histopatológica

A **Figura 26** mostra as alterações histopatológicas causadas pela UAE nos olhos de coelhos quando comparada aos olhos saudáveis e tratados com implante de SRL-PLGA após 35 dias da indução. Consistente com os achados clínicos a extensão do infiltrado inflamatório foi significativamente maior no grupo não tratado tanto para o corpo ciliar quanto para a retina (**Figura 26C e D, respectivamente**). Estes resultados sugerem que grande quantidade de células inflamatórias permaneceu na retina durante o período avaliado. Em contraste, o infiltrado inflamatório do grupo tratado foi menor no corpo ciliar e retina (**Figura 26E e F, respectivamente**). Além disso, o grupo controle UAE apresentou parcial destruição da camada de células fotorreceptoras e parcial perda dos segmentos externos nesses animais quando comparados aos animais tratados com implante de SRL-PLGA (**Figura 26D e F, respectivamente**).

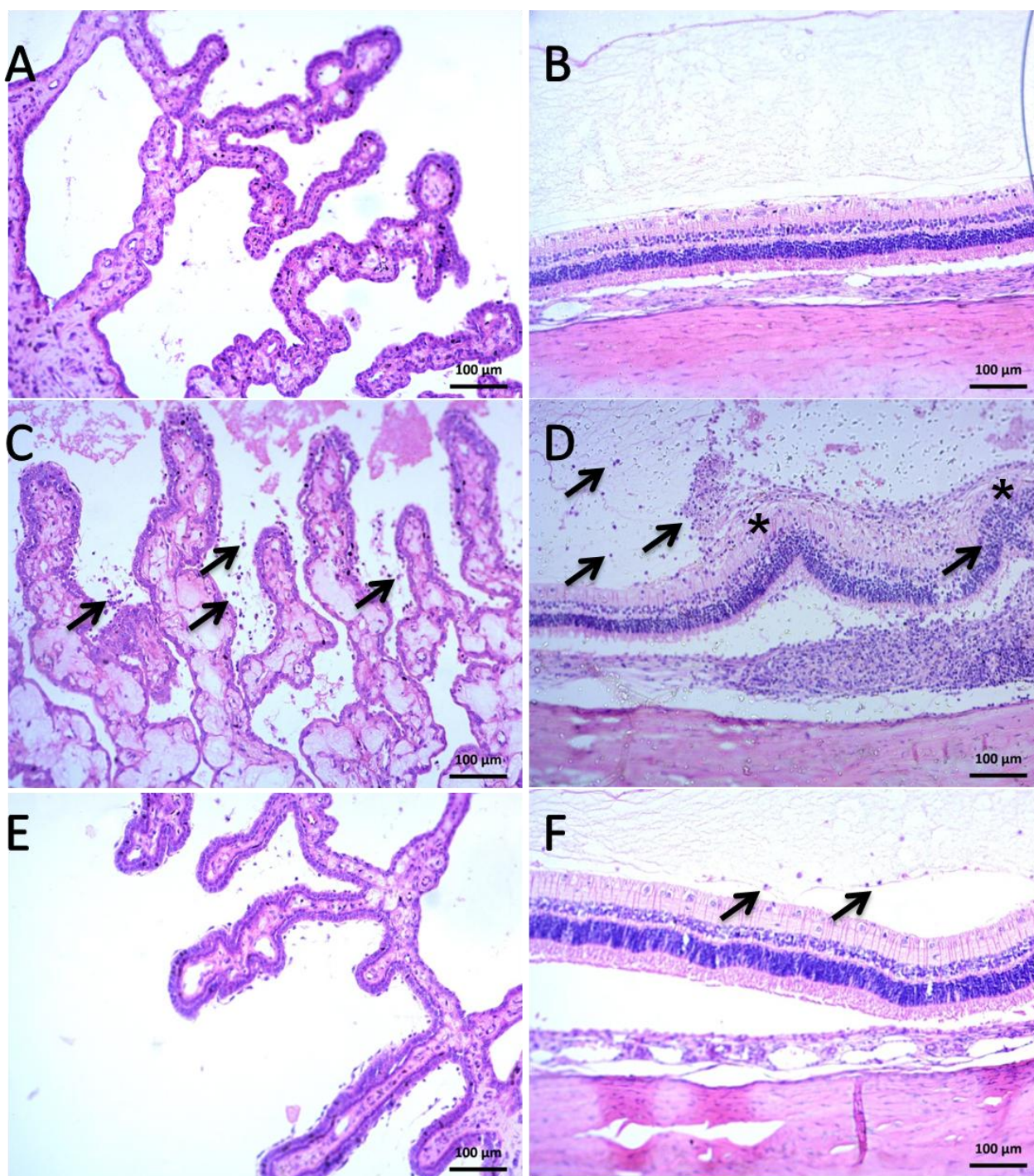
Em nosso estudo observamos que, uma semana após a indução da UAE, os coelhos apresentaram alterações mais severas no segmento anterior nos animais não tratados com o implante, como: miose, sinéquias, hiperemia conjuntival, congestão iriana, células na câmara anterior aumento dos vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade vascular devido ao processo inflamatório. Devido à alteração da permeabilidade vascular, é provável que o SRL liberado no segmento posterior tenha alcançado o segmento anterior. Por meio do exame histopatológico foi possível confirmar de forma mais precisa que o infiltrado de células inflamatórias no segmento anterior era maior no grupo controle UAE em relação ao grupo tratado com os implantes.

Os resultados deste estudo são comparáveis a outros trabalhos anteriores que revelaram os mesmos danos na retina durante uveíte experimental, com alterações, infiltrados inflamatórios extensos e desorganização de diferentes camadas da retina (CHENG *et al.*, 1995; JAFFE *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2014; KHALILI *et al.*, 2018). Alguns autores atribuem os danos nos tecidos oculares à produção de citocinas por células inflamatórias (MÉRIDA *et al.*, 2015; TOURI *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2019).

Embora a classificação da inflamação ocular por exames clínicos seja o padrão ouro para o diagnóstico clínico da uveíte, a precisão em modelos animais é altamente dependente da qualidade da amostra. Por isso a necessidade de técnicas complementares para um

delineamento mais preciso da eficácia do sistema de liberação no tratamento efetivo da doença.

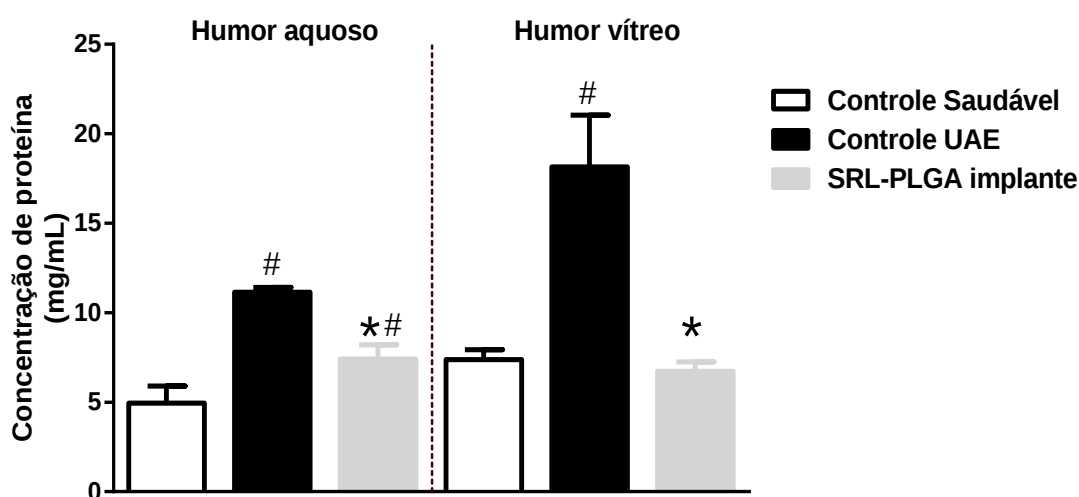
Figura 26 - Fotografias representativas de cortes histológicos de olhos saudáveis (A e B); não tratados (C e D) e tratados com implante de SRL-PLGA (E e F) após 35 dias da indução da uveíte. Seções do corpo ciliar (A, C e E) e retina (B, D e F). Podem ser observados infiltrados inflamatórios extensos nos animais não tratados e pouca inflamação ou infiltrados celular nos olhos tratados com implante SRL-PLGA. Setas pretas: sinais de infiltrado inflamatório; asterisco: desorganização das camadas da retina.



2.3 Quantificação de proteínas no humor aquoso e humor vítreo

A integridade das barreiras BHA e BHR, a intensidade da inflamação intraocular induzida pelo modelo de UAE e a eficácia do tratamento podem ser avaliadas indiretamente pela medida da concentração de proteína no humor aquoso e humor vítreo, respectivamente (ALAMI-MILANI *et al.*, 2019). As concentrações de proteínas no humor aquoso e humor vítreo encontradas neste estudo vão de encontro com as observações clínicas e os achados histopatológicos entre olhos tratados e não-tratados ao final do tempo avaliado (**Figura 27**). Nos olhos tratados, os implantes de SRL-PLGA reduziram a concentração de proteína no humor aquoso em comparação com os olhos não tratados ($p=0,0046$). A presença de células e proteínas no segmento anterior são parâmetros indicadores e quantificáveis da gravidade da inflamação, bem como da integridade da BHA (BOLLIGER *et al.*, 1980; RATAY *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2019). No presente estudo, os *scores* clínicos e de células no segmento anterior, os achados histopatológicos e a quantificação de proteínas no humor aquoso, quando analisados em conjunto, sugerem que os implantes de SRL-PLGA inibiram a quebra da BHA.

Figura 27 - Quantidade total de proteína presente no humor aquoso e humor vítreo após 35 dias da indução da uveíte, quantificadas pelo método Lowry. *Representa diferença estatística do controle UAE e # representa diferença do controle saudável ($n=4$; $p<0,05$)



Da mesma forma que observado para a dosagem de proteínas do humor aquoso, nos olhos tratados com implante de SRL-PLGA a concentração de proteínas no humor vítreo foi significativamente menor que nos olhos não tratados ($p=0,0037$). A extensão dos danos na BHR pode ser estimada diretamente usando angiografia com fluoresceína e fluorofotometria do vítreo ou indiretamente usando exame clínico, ensaios de acúmulo de proteína vítrea ou subprodutos de inflamação e contagem de células inflamatórias (METRIKIN *et al.*, 1995).

Metrikin e colaboradores (1995) avaliaram o efeito de diferentes doses de endotoxina na função da BHR de coelhos pigmentados e observaram que para doses de 0,01µg a 500 µg de antígeno as concentrações de proteína produzidas no humor vítreo foram significativamente maiores do que o grupo controle. Além disso, foi demonstrada correlação entre a concentração de proteína no humor vítreo e o *score* clínico. Resultados semelhantes ao descritos no estudo acima foram encontrados neste estudo, pois os sinais clínicos de *flare*, *haze* e opacidade vítrea foram maiores nos animais controle UAE, bem como a concentração de proteínas no humor vítreo em relação aos animais que receberam os implantes de SRL-PLGA após 35 dias da indução da uveíte.

2.4 Análise de infiltrados celulares por quantificação das enzimas MPO e NAG

A UAE é um modelo animal que mimetiza as características clínicas e histopatológicas da doença humana, mediada por células T CD4⁺, na qual células polimorfonucleares (PMN) e monócitos/macrófagos desempenham um importante papel como células efetoras da inflamação intraocular (KERR *et al.*, 2008; KEZIC; MCMENAMIN, 2010; GOLDBERG *et al.*, 2016). A quebra da barreira BHR leva à infiltração de células inflamatórias nos segmento anterior e posterior do olho, seguida de danos às células fotorreceptores (BOUSQUET *et al.*, 2012; KLAASSEN *et al.*, 2013)

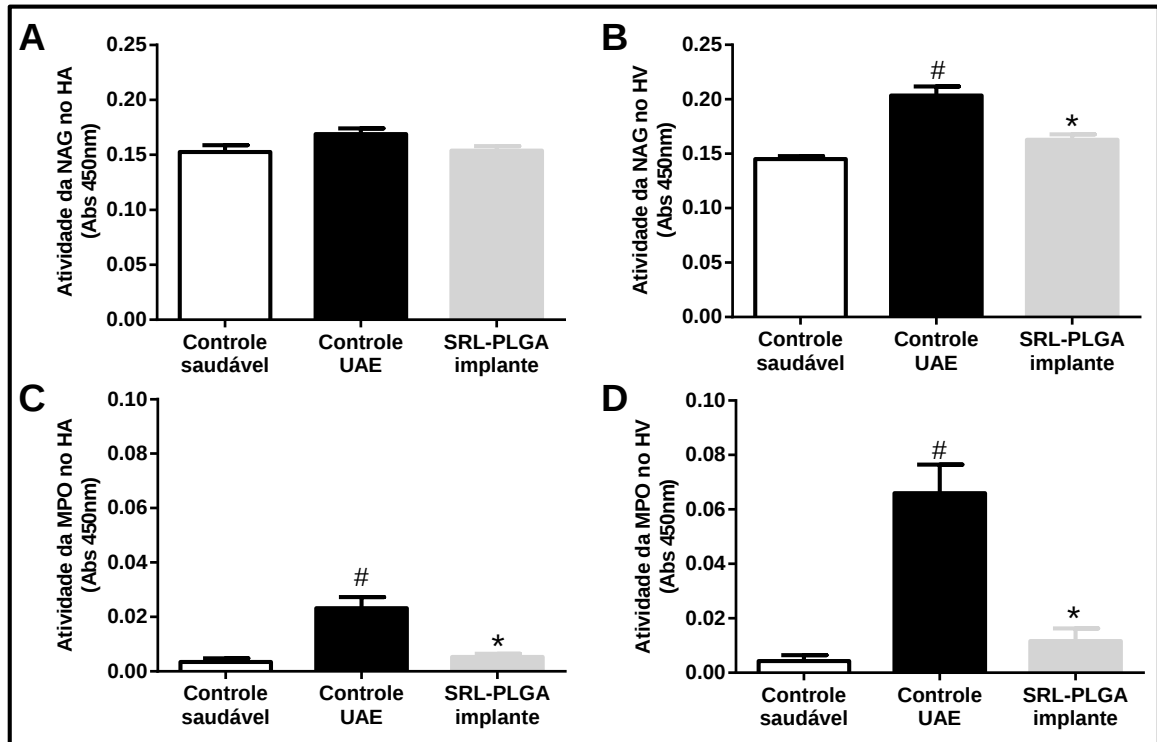
Para a análise do infiltrado de macrófagos no humor aquoso e humor vítreo, foi avaliada a atividade da enzima NAG após 35 dias da indução da uveíte pela administração intravítrea do BCG. Os macrófagos, tanto residentes quanto os infiltrados após a quebra da BHR, desempenham papéis relevantes na uveíte como efetores da imunidade inata e indutores da imunidade adquirida. Os resultados mostram que a atividade da NAG no humor aquoso dos animais tratados com implante de SRL-PLGA não foi diferente do grupo controle UAE (**Figura 28A**). A atividade da NAG semelhante entre os grupos controle saudável, controle UAE e tratados com o implante contendo SRL no humor aquoso pode estar relacionada à presença de macrófagos residentes, os quais desempenham papéis como células sentinela e responsáveis por reconhecer moléculas ligadas a patógenos ou causadoras de danos no olho c. Além disso, os *scores* clínicos corroboram com este resultado uma vez que a reação inflamatória no segmento anterior diminui tanto para o grupo controle UAE quanto para o grupo tratado com implante SRL-PLGA.

No entanto, a atividade da NAG no humor vítreo foi reduzida no grupo tratado em relação ao grupo não tratado ($p=0,0003$) e foi semelhante ao grupo controle saudável ($p=0,1980$) após 35 dias da indução da uveíte (**Figura 28B**). Embora existam relatos na literatura que descrevam o aumento de macrófagos, principalmente nos estágios iniciais, alguns estudos também demonstraram a presença de macrófagos na fase de resolução da doença (MÉRIDA *et al.*, 2015b).

Ao contrário do que ocorre com a enzima NAG, a MPO não é encontrada em tecidos saudáveis. Durante o processo inflamatório há o extravasamento vascular e o recrutamento de células PMNs circulantes para o local da lesão. Clinicamente, a presença de PMNs na câmara anterior do olho pode ser prontamente detectada pelo exame com lâmpada de fenda. No entanto, devido à natureza imuno privilegiada do olho, apenas uma fração das células PMNs se infiltra nos tecidos oculares. Desse modo, uma abordagem bioquímica da atividade da MPO, uma enzima dos grânulos azurófilos de células PMNs (neutrófilos), permite uma quantificação precisa do número de células PMNs infiltradas nos tecidos oculares (GRAFF *et al.*, 1998; KARIM *et al.*, 2009).

Como ilustrado na **Figura 28C e D**, a atividade da MPO no humor aquoso e humor vítreo foi menor nos animais tratados com o implante de SRL-PLGA comparadas aos animais controle UAE ($p=0,0023$ e $0,0002$; respectivamente). Além disso, não houve diferença estatística entre os animais tratados com implante e animais controle saudáveis ($p=0,8735$ e $0,6054$; respectivamente), o que reflete a redução do acúmulo de neutrófilos, tanto no segmento anterior quanto no segmento posterior, em níveis comparáveis com os animais saudáveis após 35 dias da indução da uveíte. A melhora nos *scores* clínicos (**Figura 24**) pode, portanto, estar relacionada a uma redução de células inflamatórias evidenciada pela menor atividade da MPO e demonstrada pela histologia no grupo de animais que foram tratados os implantes de SRL-PLGA (**Figura 26**).

Figura 28 - Avaliação da infiltração de macrófagos e neutrófilos pela atividade das enzimas NAG (A e B) e MPO (C e D) no humor aquoso (HA) e humor vítreo (HV), respectivamente, de animais controle saudável, controle UAE e tratados com implante de SRL-PLGA após 35 dias. n=5, resultados expressos em média $\pm$ erro padrão; one-way ANOVA. *Representa diferença estatística do controle UAE e # representa diferença do controle saudável (n=4; p<0,05).



Em decorrência da natureza recorrente da uveíte autoimune, sistemas de liberação prolongada têm sido desenvolvidos a fim de evitar injeções intravítreas frequentes que podem desencadear catarata, endoftalmite, aumento da PIO, além do desconforto ao paciente. Atualmente existem dois implantes biodegradáveis de liberação prolongada aprovados pelo FDA, o Retisert® (Bausch + Lomb, Rochester, NY, USA) e o Ozurdex® (Allergan, Irvine, CA, USA), capazes de liberar de maneira sustentada fluocinolona acetônida e dexametasona, respectivamente (PEPPLE *et al.*, 2015). Os estudos pré-clínicos destes sistemas de liberação foram inicialmente conduzidos em modelo de uveíte autoimune desenvolvido em coelhos e a eficácia neste modelo foi associada à eficácia final no tratamento de doenças humanas (CHENG *et al.*, 1995; JAFFE *et al.*, 1998; MRUTHYUNJAYA *et al.*, 2006; CALLANAN *et al.*, 2008). Para isso foi realizada a pré-imunização subcutânea do antígeno *Mycobacterium tuberculosis*, seguida por injeção intravítrea do mesmo. Com a intenção de avaliar a eficácia dos sistemas na recorrência da doença, uma nova injeção intravítrea do antígeno foi realizada (CHENG *et al.*, 1995; JAFFE *et al.*, 1998).

Como elucidado nos estudos do perfil de liberação realizados no **Capítulo II**, o implante de SRL-PLGA apresenta liberação prolongada e fornece altas concentrações de SRL na 4ª semana (28 dias), seguido por níveis mais baixos de manutenção do fármaco. Esse fato corrobora com os *scores* significativamente menores em relação aos animais não tratados durante todo o período avaliado. Com base na literatura, a UAE é uma doença ocular progressiva que pode aumentar gradualmente em seu efeito, e o SRL liberado gradualmente de implantes poliméricos biodegradáveis corresponderá ao progresso da doença e, portanto, os implantes de SRL-PLGA apresentaram um bom efeito terapêutico no modelo testado.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o implante de SRL pode fornecer uma melhor relação risco-benefício quando comparado a repetidas injeções de SRL e a administração oral para o tratamento da uveíte posterior. Além disso, os modelos animais de uveíte autoimune tem sido uma importante ferramenta tanto para elucidação dos aspectos fisiopatológicos da doença, quanto para a avaliação da eficácia de novos fármacos e de sistemas de liberação prolongada (CHENG *et al.*, 1995; JAFFE *et al.*, 1998).

3 CONCLUSÃO

A administração intravítrea de SRL a partir de um sistema biodegradável de liberação prolongada foi eficaz no controle da inflamação intraocular em um modelo de uveíte autoimune experimental em coelhos. Os *scores* clínicos obtidos por avaliação clínica foram significativamente reduzidos nos animais tratados com o implante de SRL-PLGA em relação aos animais controle durante UAE após 35 dias do estudo. Por meio da avaliação histopatológica foi possível observar infiltrado inflamatório mais intenso no grupo controle UAE em relação ao grupo tratado, tanto no segmento anterior quanto no segmento posterior. A redução da quantidade de proteínas no humor aquoso e humor vítreo no grupo que recebeu o implante sugere efeito protetor do tratamento na integridade das BHA e BHR. Além disso, a quantificação indireta de macrófagos e neutrófilos corrobora os achados clínicos e histológicos. Desta forma, o desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada biodegradável contendo um fármaco imunossupressor e com atividade anti-VEGF como o SRL se torna uma alternativa muito atraente para o controle da uveíte autoimune.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para desenvolver sistemas de liberação intraocular de fármacos mais seguros e eficazes se faz necessário conhecer o perfil de liberação deste no vítreo a fim de predizer a duração do efeito terapêutico. A primeira etapa deste trabalho permitiu o desenvolvimento e validação de um método seletivo e sensível por UPLC-MS/MS para a quantificação do SRL liberado em olhos de coelhos a partir de implantes de SRL-PLGA previamente desenvolvidos. Os implantes permitiram a liberação SRL no vítreo de coelhos albinos por até oito semanas com concentração de fármaco eficaz, com pico máximo de liberação na quarta semana.

O implante de SRL-PLGA não causou alteração significativa da pressão intraocular, alterações clínicas relevantes, alterações morfológicas ou funcionais da retina, demonstrando a segurança do uso intraocular dos implantes de SRL-PLGA.

A liberação prolongada de SRL a partir do sistema desenvolvido foi eficaz no controle da inflamação em modelo de uveíte autoimune em coelhos, com melhora significativa dos sinais clínicos e redução do infiltrado inflamatório. Assim, o presente trabalho mostrou que o implante de SRL-PLGA é uma promissora alternativa para o tratamento da uveíte autoimune.

PERSPECTIVAS

Futuros estudos que avaliem a toxicidade de diferentes doses de SRL no sistema desenvolvido em animais com uveíte por eletrorretinografia e tomografia de coerência óptica (OCT, *Optical Coherence Tomography*) são necessários para confirmar a ausência de alterações morfológicas e funcionais na retina desses animais. Adicionalmente, estudos usando a técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI *Imaging* (do inglês - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) poderão contribuir para melhor elucidação da biodistribuição do SRL liberado dos implantes desenvolvidos, bem como de seus metabólitos nos tecidos oculares. Além disso, estudos que avaliem a eficácia do implante em outros marcadores inflamatórios são de fundamental importância para prosseguir para estudos clínicos.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA OBTIDA DURANTE O DOUTORADO:

- **Artigos publicados**

- ✓ TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V. V.; DOURADO, L. F. N.; **PAIVA, M. R. B.**; CUNHA JUNIOR, A. S. Corosolic acid: antiangiogenic activity and safety of intravitreal injection in rats eyes. **Documenta Ophthalmologica**, 2019.
- ✓ **PAIVA, M. R. B.**; LAGE, N. A.; GUERRA, M. C. A.; MOL, M. P. G.; RIBEIRO, M. C. S.; FULGENCIO, G. O. ; GOMES, D. A.; CÉSAR, I.C.; FIALHO, S. L.; CUNHA JUNIOR, A. S. Toxicity and in vivo release profile of sirolimus from implants into the vitreous of rabbits' eyes. **Documenta Ophthalmologica**, v. 138, p. 3-19, 2018. (Anexo II)
- ✓ RODRIGUES, F. S.; **PAIVA, M. R. B.**; DOURADO, L. F. N.; SILVA, R. O.; SILVA, C. N.; COSTA, B. L.; TOLEDO, C. R.; LIMA, M. E.; CUNHA JUNIOR, A. S. Intravitreal injection of the synthetic peptide LyeTx I b, derived from a spider toxin, into the rabbit eye is safe and prevents neovascularization in a chorioallantoic membrane model. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, 2018.
- ✓ COSTA, B. L.; MACHADO, R. R.; **PAIVA, M. R. B.**; SERAKIDES, R.; COELHO, M. M.; CUNHA-JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.. Sirolimus-loaded biodegradable implants induce long lasting anti-inflammatory and antiangiogenic effects. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 373-379, 2018.

- **Patentes**

- ✓ RODRIGUES, F. S.; **PAIVA, M. R. B.**; DOURADO, L. F. N.; SILVA, R. O.; COSTA, B. L.; TOLEDO, C. R.; SILVA, C. N.; LIMA, M. E.; CUNHA JUNIOR, A. S. Composição farmacêutica para aplicação intravítrea e seu uso no tratamento de doenças da retina. 2018, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR1020180163183, título: "Composição farmacêutica para aplicação intravítrea e seu uso no tratamento de doenças da retina", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 09/08/2018.

- **Trabalhos apresentados em eventos científicos**

- ✓ TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V. V.; DOURADO, L. F. N.; **PAIVA, M. R. B.**; CUNHA JUNIOR, A. S. Ophthalmic application and evaluation of corosolic acid toxicity. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2018.
- ✓ **PAIVA, M. R. B.**; ANDRADE, G. F.; DOURADO, L. F. N.; CASTRO, B. F. M.; SOUSA, E. M. B.; CUNHA JUNIOR, A. S. Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vivo da biocompatibilidade de nanopartículas à base de sílica mesoporosa contendo tacrolimus. In: III Simpósio em Ciências Farmacêuticas, 2018.
- ✓ **PAIVA, M. R. B.**; GUERRA, M. C. A.; LAGE, N. A.; RIBEIRO, M. C. S.; FULGENCIO, G. O.; CÉSAR, I.C.; FIALHO, S. L.; CUNHA JUNIOR, A. S. Development and validation of a LC-MS/MS method for quantitation of sirolimus release from ocular implants in the vitreous humor of rabbits. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2017.
- ✓ **PAIVA, M. R. B.**; OLIVEIRA, C. R.; RIBEIRO, M. C. S. ; GOES, A. M. ; GOMES, D. A. ; CUNHA JUNIOR, A. S. . Avaliação da biocompatibilidade e efeito antiangiogênico de implantes poliméricos contendo sirolimus. In: II Simpósio em Ciências Farmacêuticas, 2016.
- ✓ **PAIVA, M. R. B.**; OLIVEIRA, C. R.; RIBEIRO, M. C. S.; GOES, A. M.; GOMES, D. A.; CUNHA JUNIOR, A. S. Avaliação do perfil de liberação in vitro e citotoxicidade de sistema polimérico contendo sirolimus destinado à aplicação intravítreo. In: V CONCIFOP, Congresso de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto, UFOP, 2016, Ouro Preto- MG. V CONCIFOP, Congresso de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto, UFOP, 2016.

- **Prêmio**

- ✓ The ABCF Young Investigator Award 2018 com apresentação oral do trabalho **“Toxicity of sirolimus intravitreal implants in normal rabbit eyes”** no IV Congresso da associação brasileira de ciências farmacêuticas. São Paulo, (SP), Brasil, 6 a 8 de setembro, 2018.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R. T.; GIBBONS, J. J.; GRAZIANI, E. I. Chemistry and pharmacology of rapamycin and its derivatives. **Enzymes**, v. 27, n. C, p. 329–366, 2010.
- ACHARYA, N. R.; THAM, V. M.; ESTERBERG, E.; et al. Incidence and Prevalence of Uveitis Results From the Pacific Ocular Inflammation Study. **JAMA ophthalmology**, v. 131, n. 11, p. 1405–1412, 2013.
- AGRAHARI, VIBHUTI; AGRAHARI, VIVEK; MANDAL, A.; PAL, D.; MITRA, A. K. How are we improving the delivery to back of the eye? Advances and challenges of novel therapeutic approaches. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5247, n. December 2016, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2017.1272569>>. .
- AIRODY, A.; HEATH, G.; LIGHTMAN, S.; GALE, R. Non-Infectious Uveitis: Optimising the Therapeutic Response. **Drugs**, v. 76, n. 1, p. 27–39, 2016.
- ALAMI-MILANI, M.; ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H.; et al. Evaluation of anti-inflammatory impact of dexamethasone-loaded PCL-PEG-PCL micelles on endotoxin-induced uveitis in rabbits. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1–9, 2019.
- ALMEIDA, F. P. P. DE; SALIBA, J. B.; RIBEIRO, J. A. S.; et al. In vivo release and retinal toxicity of cyclosporine-loaded intravitreal device. **Documenta Ophthalmologica**, v. 131, n. 3, p. 207–214, 2015.
- AMO, E. M. DEL; RIMPELÄ, A. K.; HEIKKINEN, E.; et al. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 57, n. 2017, p. 134–185, 2017. Elsevier Ltd.
- AMO, E. M. DEL; VELLONEN, K.-S.; KIDRON, H.; URTTI, A. Intravitreal clearance and volume of distribution of compounds in rabbits: In silico prediction and pharmacokinetic simulations for drug development. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 95, p. 215–226, 2015.
- ARCINUE, C. A.; CERO, O. M.; FOSTER, C. S. A comparison between the fluocinolone acetonide (Retisert) and dexamethasone (Ozurdex) intravitreal implants in uveitis. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 501–507, 2013.
- AWWAD, S.; MOHAMED AHMED, A. H. A.; SHARMA, G.; et al. Principles of pharmacology in the eye. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 23, p. 4205–4223, 2017.
- AYYILDIZ, O.; DURUKAN, A. H.; OZGURTAS, T.; GUNAL, A. A Comparison of Intravitreal Bevacizumab and Steroid Activity in an Experimental Uveitis Model. **Current Eye Research**, v. 40, n. 12, p. 1261–1268, 2015.
- BARAR, J.; AGHANEJAD, A.; FATHI, M.; OMIDI, Y. Advanced drug delivery and targeting technologies for the ocular diseases. **BioImpacts**, v. 6, n. 1, p. 49–67, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15171/bi.2016.07>>. .
- BARRY, R. J.; NGUYEN, Q. D.; LEE, R. W.; MURRAY, P. I.; DENNISTON, A. K. Pharmacotherapy for uveitis: current management and emerging therapy. **Clinical**

Ophthalmology, v. 8, p. 1891, 2014.

BJORNSTI, M.; HOUGHTON, P. J. The tor pathway: a target for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 5, p. 335–348, 2004.

BODDU, S. H.; NESAMONY, J. Utility of Transporter/Receptor(S) in Drug Delivery To the Eye. **World Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2013.

BOLLIGER, G. A.; KUPFERMAN, A.; LEIBOWITZ, H. M. Quantitation of Anterior Chamber Inflammation and Its Therapy. **Archives of Ophthalmology**, v. 98, p. 1110–1114, 1980.

BOURGES, J. L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; et al. Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 11, p. 1182–1202, 2006.

BOUSQUET, E.; ZHAO, M.; LY, A.; et al. The Aldosterone-Mineralocorticoid Receptor Pathway Exerts Anti-Inflammatory Effects in Endotoxin-Induced Uveitis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–10, 2012.

BOYER, D. S.; YOON, Y. H.; BELFORT, R.; et al. Trial of Dexamethasone Intravitreal Implant in Patients with Diabetic Macular Edema. **Ophthalmology**, v. 121, n. 10, p. 1–11, 2014.

BUECH, G.; BERTELMANN, E.; PLEYER, U.; SIEBENBRODT, I.; BORCHERT, H.-H. Formulation of sirolimus eye drops and corneal permeation studies. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 292–303, 2007.

CALLANAN, D. G.; JAFFE, G. J.; MARTIN, D. F.; PEARSON, P. A.; COMSTOCK, T. L. Treatment of Posterior Uveitis With a Fluocinolone Acetonide Implant. **Archives of Ophthalmology**, v. 126, n. 9, p. 1191–1201, 2008.

CASPI, R. R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 9, p. 3073–3083, 2010.

CASTIBLANCO, C.; FOSTER, C. S. Review of Systemic Immunosuppression for Autoimmune Uveitis. **Ophthalmology and Therapy**, v. 3, n. 1–2, p. 17–36, 2014.

CHENG, C.; BERGER, A. S.; PEARSON, P. A.; ASHTON, P.; JAFFE, G. J. Intravitreal Sustained-Release Dexamethasone Device in the Treatment of Experimental Uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 36, n. 2, p. 442–453, 1995.

CHERINET, F. M.; TEKALIGN, S. Y.; ANBESSE, D. H.; BIZUNEH, Z. Y. Prevalence and associated factors of low vision and blindness among patients attending St . Paul’s Hospital Millennium Medical College , Addis Ababa , Ethiopia. **BMC ophthalmology**, v. 18, n. 1, p. 232, 2018. BMC Ophthalmology.

CHOLKAR, K.; GUNDA, S.; EARLA, R.; PAL, D.; MITRA, A. K. Nanomicellar Topical Aqueous Drop Formulation of Rapamycin for Back-of-the-Eye Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 3, p. 610–622, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425389>>. .

CUNHA, R. B.; SIQUEIRA, R. C.; MESSIAS, A.; et al. Safety and feasibility of a novel 25-gauge biodegradable implant of dexamethasone for treatment of macular edema associated

with retinal vein occlusion: a Phase I Clinical Trial. **Retinal cases & Brief Reports**, v. 12, n. 1, p. 50–58, 2018.

DAMICO, F. M.; SCOLARI, M. R.; IOSHIMOTO, G. L.; et al. Vitreous pharmacokinetics and electroretinographic findings after intravitreal injection of acyclovir in rabbits. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 67, n. 8, p. 931–7, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3416900&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DEJNEKA, N. S.; KUROKI, A. M.; FOSNOT, J.; et al. Systemic rapamycin inhibits retinal and choroidal neovascularization in mice. **Molecular vision**, v. 10, n. March, p. 964–972, 2004.

DELPLACE, V.; PAYNE, S.; SHOICHET, M. Delivery strategies for treatment of age-related ocular diseases: From a biological understanding to biomaterial solutions. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 652–668, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.065>>. .

DOUGLAS, L. C.; YI, N. Y.; DAVIS, J. L.; SALMON, J. H.; GILGER, B. C. Ocular toxicity and distribution of subconjunctival and intravitreal rapamycin in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 6, p. 511–516, 2008.

DUGEL, P. U.; BLUMENKRANZ, M. S.; HALLER, J. A.; et al. A randomized, dose-escalation study of subconjunctival and intravitreal injections of sirolimus in patients with diabetic macular edema. **Ophthalmology**, v. 119, n. 1, p. 124–131, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.07.034>>. .

DURRANI, O. M.; MEADS, C. A.; MURRAY, P. I. Uveitis: A potentially blinding disease. **Ophthalmologica**, v. 218, n. 4, p. 223–236, 2004.

EARLA, R.; CHOLKAR, K.; GUNDA, S.; EARLA, R. L.; MITRA, A. K. Bioanalytical method validation of rapamycin in ocular matrix by QTRAP LC-MS/MS: Application to rabbit anterior tissue distribution by topical administration of rapamycin nanomicellar formulation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 908, p. 76–86, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.014>>. .

EDMOND, M.; YUAN, A.; BELL, B. A.; et al. The Feasibility of Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Grading of Anterior Chamber Inflammation in a Rabbit Model of Anterior Uveitis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 57, n. 9, p. OCT184–OCT188, 2016.

ELJARRAT-BINSTOCK, E.; PE'ER, J.; DOMB, A. J. New techniques for drug delivery to the posterior eye segment. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 530–543, 2010.

ELSAID, N.; SOMAVARAPU, S.; JACKSON, T. L. Cholesterol-poly(ethylene) glycol nanocarriers for the transscleral delivery of sirolimus. **Experimental Eye Research**, v. 121, p. 121–129, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2014.02.001>>. .

EVANS, L. S.; PEACHEY, N. S.; MARCHESE, A. L. Comparison of three methods of estimating the parameters of the Naka-Rushton equation. **Documenta ophthalmologica**, v. 84, n. 1, p. 19–30, 1993. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223107>%5Cn<http://link.springer.com/article/10.1007/BF01203279>>. .

FERNANDES-CUNHA, G. M.; FIALHO, S. L.; SILVA, G. R. DA; et al. Ocular safety of Intravitreal Clindamycin Hydrochloride Released by PLGA Implants. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 5, p. 1083–1092, 2017.

FERNANDES-CUNHA, G. M.; GOUVEA, D. R.; FULGÊNCIO, G. DE O.; et al. Development of a method to quantify clindamycin in vitreous humor of rabbits' eyes by UPLC-MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study and in vivo ocular biocompatibility evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 346–352, 2015.

FERNANDEZ, D. G.; NASCIMENTO, H.; NASCIMENTO, C.; et al. Uveitis in São Paulo , Brazil : 1053 New Patients in 15 Months Uveitis in São Paulo , Brazil : 1053 New Patients in 15 Months. **Ocular Immunology and Inflammation ISSN:**, v. 00, n. 00, p. 1–6, 2016.

FIALHO, S. L.; CUNHA, A. DA S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: Bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 173–179, 2007.

FIALHO, S. L.; RÊGO, M. B.; SIQUEIRA, R. C.; et al. Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. **Current Eye Research**, v. 31, n. 6, p. 525–34, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16769612>>. .

FIALHO, S. L.; REGO, M. G. B.; CARDILLO, J. A.; et al. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891–896, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492003000700029&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

FIALHO, S. L.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A. Biodegradable implants for ocular delivery of anti-inflammatory drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, n. 1, p. 93–97, 2007.

FIALHO, S. L.; SOUZA, P. A F.; FULGÊNCIO, G. O.; et al. In vivo release and retinal safety of intravitreal implants of thalidomide in rabbit eyes and antiangiogenic effect on the chorioallantoic membrane. **Journal of drug targeting**, v. 21, n. 9, p. 837–45, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23952807>>. .

FISCHER, N.; NARAYANAN, R.; LOEWENSTEIN, A.; KUPPERMANN, B. D. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **European Journal of Ophthalmology**, v. 21, p. S20-26, 2011.

FORREST, M. L.; WON, C. Y.; MALICK, A. W.; KWON, G. S. In vitro release of the mTOR inhibitor rapamycin from poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 2, p. 370–377, 2006.

FORRESTER, J. V; KUFFOVA, L.; DICK, A. D. Autoimmunity, Autoinflammation, and Infection in Uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 189, p. 77–85, 2018. The Authors. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.02.019>>. .

FOSTER, C. S.; KOTHARI, S.; ANESI, S. D.; et al. The Ocular Immunology and Uveitis Foundation preferred practice patterns of uveitis management. **Survey of Ophthalmology**, v. 61, n. 1, p. 1–17, 2016.

GABRIEL, D.; MUGNIER, T.; COURTHION, H.; et al. Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 16–24, 2016.

GALLEGO-PINAZO, R.; DOLZ-MARCO, R.; MARTÍNEZ-CASTILLO, S.; et al. Update on the Principles and Novel Local and Systemic Therapies for the Treatment of Non-Infectious Uveitis. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 12, p. 38–45, 2013.

GOLDBERG, G. L.; CORNISH, A. L.; MURPHY, J.; et al. G-CSF and Neutrophils Are Nonredundant Mediators of Murine Experimental Autoimmune Uveoretinitis. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 1, p. 172–184, 2016. American Society for Investigative Pathology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.008>>. .

GONZÁLEZ, M. M.; SOLANO, M. M.; PORCO, T. C.; et al. Epidemiology of uveitis in a US population-based study. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v. 8, n. 1, p. 6, 2018. Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection.

GRAFF, G.; GAMACHE, D. A.; BRADY, M. T.; SPELLMAN, J. M.; YANNI, J. M. Improved Myeloperoxidase Assay for Quantitation of Neutrophil Influx in a Rat Model of Endotoxin-Induced Uveitis. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 39, n. 3, p. 169–178, 1998.

GRITZ, D. C.; SCHWABER, E. J.; WONG, I. G.; GRITZ, D. C. Complications of Uveitis : The Northern California Epidemiology of Uveitis Study Complications of Uveitis : The Northern California Epidemiology of Uveitis Study. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 26, n. 4, p. 584–594, 2017. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09273948.2016.1247174>>. .

GUBA, M. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. **Nature Medicine**, v. 8, n. 2, p. 128–135, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm0202-128>>. .

GUO, D.; LIB, Q.; SUNC, Y.; et al. Evaluation of Controlled-release Triamcinolone Acetonide-loaded mPEG-PLGA Nanoparticles in Treating Experimental Autoimmune Uveitis. **Nanotechnology**, 2019.

HALLER, J. A.; BANDELLO, F.; BELFORT, R.; et al. Dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema related to branch or central retinal vein occlusion: Twelve-month study results. **Ophthalmology**, v. 118, n. 12, p. 2453–2460, 2011.

HASSAN, M.; KARKHUR, S.; BAE, J.; et al. New therapies in development for the management of non- infectious uveitis: a review. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, 2019.

HIMAWAN, E.; EKSTRÖM, P.; BUZGO, M.; et al. Drug delivery to retinal photoreceptors. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644618305117>>. .

HOU, H.; NIETO, A.; BELGHITH, A.; et al. A sustained intravitreal drug delivery system

with remote real time monitoring capability. **Acta Biomaterialia**, v. 24, p. 309–321, 2015.

IBRAHIM, M. A.; SEPAH, Y. J.; WATTERS, A.; et al. One-Year Outcomes of the SAVE Study: S irolimus as a Therapeutic A pproach for U VE itis. **Translational Vision Science & Technology**, v. 4, n. 2, p. 4, 2015. Disponível em: <<http://tvst.arvojournals.org/Article.aspx?doi=10.1167/tvst.4.2.4>>. .

IKEDA, E.; HIKITA, N.; ETO, K.; MOCHIZUKI, M. Tacrolimus-rapamycin combination therapy for experimental autoimmune uveoretinitis. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 41, n. 6, p. 396–402, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002151559700083X>>. .

JAFFE, G. J.; FOSTER, C. S.; PAVESIO, C. E.; PAGGIARINO, D. A.; RIEDEL, G. E. Effect of an Injectable Fluocinolone Acetonide Insert on Recurrence Rates in Chronic Noninfectious Uveitis Affecting the Posterior Segment Twelve-Month Results. **Ophthalmology**, p. 1–10, 2018. American Academy of Ophthalmology. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.opthta.2018.10.033>>. .

JAFFE, G. J.; YANG, C.; WANG, I. X.; et al. Intravitreal Sustained-release Cyclosporine in the Treatment of Experimental Uveitis. **Ophthalmology**, v. 105, n. 1, p. 46–56, 1998.

JONES, N. P.; PRADEEP, A.; JOHN, B.; et al. Certification of Vision Impairment in Patients with Uveitis Attending a Specialist Clinic. **Ocular Immunology and Inflammation**, p. 1–5, 2018. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09273948.2018.1441874>>. .

JOSEPH, M.; TRINH, H. M.; CHOLKAR, K.; PAL, D.; MITRA, A. K. Recent perspectives on the delivery of biologics to back of the eye. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5247, n. August, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2016.1227783>>. .

JOZWIAK, J.; JOZWIAK, S.; OLDAK, M. Molecular activity of sirolimus and its possible application in tuberous sclerosis treatment. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 2, p. 160–180, 2006.

KANE, F. E.; BURDAN, J.; CUTINO, A.; GREEN, K. E. IluvienTM: a new sustained delivery technology for posterior eye disease. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 9, p. 1039–1046, 2008.

KANG-MIELER, J. J.; OSSWALD, C. R.; MIELER, W. F. Advances in ocular drug delivery: emphasis on the posterior segment. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 10, p. 1647–1660, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2014.935338>>. .

KARIM, J.; BHATTACHERJEE, P.; BISWAS, S.; PATERSON, C. A.; AL, K. E. T. Anti-Inflammatory Effects of Lipoxins on Lipopolysaccharide-Induced Uveitis in Rats. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 483–486, 2009.

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

KERR, E. C.; RAVENEY, B. J. E.; COPLAND, D. A.; DICK, A. D.; NICHOLSON, L. B. Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals

multiple regulatory cell populations. **Journal of Autoimmunity**, v. 31, n. 4, p. 354–361, 2008. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2008.08.006>>. .

KEZIC, J.; MCMENAMIN, P. G. Immunology and Microbiology The Monocyte Chemokine Receptor CX 3 CR1 Does Not Play a Significant Role in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Uveoretinitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 10, 2010.

KHALILI, M. R.; AMINI, A. H.; HASIRI, M. A.; et al. Evaluation of intravitreal injection of pentoxifylline in experimental endotoxin-induced uveitis in rabbits. **Veterinary Research Forum**, v. 9, n. 3, p. 239–244, 2018.

KIM, Y. C.; CHIANG, B.; WU, X.; PRAUSNITZ, M. R. Ocular delivery of macromolecules. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 172–181, 2014.

KIVILCIM, M.; PEYMAN, G. A.; KAZI, A. A.; et al. Intravitreal Toxicity of High-Dose Etanercept. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 57–62, 2007. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jop.2006.0083>>. .

KLAASSEN, I.; NOORDEN, C. J. F. VAN; SCHLINGEMANN, R. O. Progress in Retinal and Eye Research Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 34, p. 19–48, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.02.001>>. .

KLAMANN, A.; BÖTTCHER, K.; ACKERMANN, P.; et al. Intravitreal Dexamethasone Implant for the Treatment of Postoperative Macular Edema. **Ophthalmologica**, v. 236, n. 4, p. 181–185, 2017.

KNICKELBEIN, J. E.; ARMBRUST, K. R.; KIM, M.; SEN, H. N.; NUSSENBLATT, R. B. Pharmacologic Treatment of Noninfectious Uveitis. **Pharmacologic Therapy of Ocular Disease**, p. 231–268, 2016.

KRISHNA, U.; AJANAKU, D.; DENNISTON, A. K.; GKIKI, T. Uveitis: a sight-threatening disease which can impact all systems. **Postgraduate Medical Journal**, v. 93, n. 1106, p. 766–773, 2017.

KUNO, N.; FUJII, S. Recent advances in ocular drug delivery systems. **Polymers**, v. 3, n. 1, p. 193–221, 2011.

LANCE, K. D.; GOOD, S. D.; MENDES, T. S.; et al. In vitro and in vivo sustained zero-order delivery of Rapamycin (sirolimus) from a biodegradable intraocular device. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, n. 12, p. 7331–7337, 2015.

LAWWILL, T.; WACKER, W.; MACDONALD, R. The role of electroretinography in evaluating posterior uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 74, n. 6, p. 1086–1093, 1972.

LEE, J.-H.; CHA, K.-H.; CHO, W.; et al. Quantitative determination of sirolimus in dog blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and its applications to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 4, p. 1042–1047, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708510003560>>. .

- LEE, R. W.; NICHOLSON, L. B.; SEN, H. N.; et al. Autoimmune and autoinflammatory mechanisms in uveitis. **Seminars in Immunopathology**, v. 36, n. 5, p. 581–594, 2014.
- LI, G.; CAO, L.; ZHOU, Z.; et al. Rapamycin loaded magnetic Fe₃O₄/carboxymethylchitosan nanoparticles as tumor-targeted drug delivery system: Synthesis and in vitro characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 379–388, 2015.
- LI, W.; HE, B.; DAI, W.; ZHANG, Q.; LIU, Y. Evaluations of therapeutic efficacy of intravitreal injected polylactic-glycolic acid microspheres loaded with triamcinolone acetonide on a rabbit model of uveitis. **International Ophthalmology**, v. 34, n. 3, p. 465–476, 2014.
- LIN, P.; SUHLER, E. B.; ROSENBAUM, J. T. The future of uveitis treatment. **Ophthalmology**, v. 121, n. 1, p. 365–376, 2014. American Academy of Ophthalmology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.08.029>>. .
- MACDONALD, A.; SCAROLA, J.; BURKE, J. T.; ZIMMERMAN, J. J. Clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of sirolimus. **Clinical therapeutics**, v. 22 Suppl B, p. B101-121, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823378>>. .
- MANDAL, A.; PAL, D.; AGRAHARI, V.; et al. Ocular delivery of proteins and peptides: challenges and novel formulation approaches. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 126, p. 67–95, 2018.
- MANNA, S.; AUGSBURGER, J. J.; CORREA, Z. M.; et al. Noninvasive Electroretinography Assessment of Intravitreal Sustained-Release Methotrexate Microimplants in Rabbit Eyes. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 9, p. 583–594, 2016. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jop.2016.0006>>. .
- MARTIN, D. F.; DEBARGE, L. R.; NUSSENBLATT, R. B.; CHAN, C. C.; ROBERGE, F. G. Synergistic effect of rapamycin and cyclosporin A in the treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 95, p. 922–927, 1995.
- MÉRIDA, S.; PALACIOS, E.; NAVEA, A.; BOSCH-MORELL, F. New immunosuppressive therapies in uveitis treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18778–18795, 2015a.
- MÉRIDA, S.; PALACIOS, E.; NAVEA, A.; BOSCH-MORELL, F. Macrophages and uveitis in experimental animal models. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015b.
- METRIKIN, D. C.; WILSON, C. A.; BERKOWITZ, B. A.; et al. Measurement of Blood-Retinal Barrier Breakdown in Endotoxin-Induced Endophthalmitis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 36, n. 7, p. 1361–1370, 1995.
- MITA, M. M.; MITA, A.; ROWINSKY, E. K. The Molecular Target of Rapamycin (mTOR) as a Therapeutic Target Against Cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 2, n. Sup1, p. 168–176, 2003.
- MOELLER, S.; KEGLER, R.; STERNBERG, K.; MUNDKOWSKI, R. G. Influence of sirolimus-loaded nanoparticles on physiological functions of native human polymorphonuclear neutrophils. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 8, p. 1293–1300, 2012.

MRUTHYUNJAYA, P.; KHALATBARI, D.; YANG, P.; et al. Efficacy of Low-Release-Rate Fluocinolone Acetonide Intravitreal Implants to Treat Experimental Uveitis. **Archives of Ophthalmology**, v. 124, n. 7, p. 1012–1018, 2006.

MUDUMBA, S.; BEZWADA, P.; TAKANAGA, H.; et al. Tolerability and Pharmacokinetics of Intravitreal Sirolimus. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 5, p. 507–514, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jop.2011.0226>>. .

NAPOLI, K. L.; TAYLOR, P. J. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. **Therapeutic drug monitoring**, v. 23, n. 5, p. 559–586, 2001.

NEUMANN, R.; BAREQUET, D. The gap between the need for novel retinal drug delivery methods, technologies in RandD phase, and approved ocular drug delivery technologies. **Drug Discovery Today**, 2019.

NGUYEN, Q. D.; IBRAHIM, M. A.; WATTERS, A.; et al. Ocular tolerability and efficacy of intravitreal and subconjunctival injections of sirolimus in patients with non-infectious uveitis: primary 6-month results of the SAVE Study. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v. 3, n. 1, p. 32, 2013. Disponível em: <<http://joii-journal.springeropen.com/articles/10.1186/1869-5760-3-32>>. .

NGUYEN, Q. D.; MERRILL, P. T.; CLARK, W. L.; et al. Intravitreal Sirolimus for Noninfectious Uveitis: A Phase III Sirolimus Study Assessing Double-masKed Uveitis TReAtment (SAKURA). **American Academy of Ophthalmology**, v. 123, n. 11, p. 2413–2423, 2016.

NGUYEN, Q. D.; MERRILL, P. T.; SEPAH, Y. J.; et al. Intravitreal Sirolimus for the Treatment of Noninfectious Uveitis Evolution through Preclinical and Clinical Studies. **Ophthalmology**, p. 1–10, 2018a. American Academy of Ophthalmology. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.opthta.2018.06.015>>. .

NGUYEN, Q. D.; MERRILL, P. T.; SEPAH, Y. J.; et al. Intravitreal Sirolimus for the Treatment of Noninfectious Uveitis Evolution through Preclinical and Clinical Studies. **American Academy of Ophthalmology**, v. 125, n. 12, p. 1984–1993, 2018b.

NGUYEN, Q. D.; SADIQ, M. A.; SOLIMAN, M. K.; et al. The effect of different dosing schedules of intravitreal sirolimus, a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, in the treatment of non-infectious uveitis (an American Ophthalmological Society Thesis). **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 114, p. 1–14, 2016.

NIETO, A.; HOU, H.; MOON, S. W.; et al. Surface engineering of porous silicon microparticles for intravitreal sustained delivery of rapamycin. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, n. 2, p. 1070–1080, 2015.

NUSSENBLAT, R. B.; PALESTINE, A. G.; CHAN, C.; ROBERGE, O. I. S. Standardization of Vitreal Inflammatory Activity in Intermediate and Posterior Uveitis. **Ophthalmology**, v. 92, n. 4, p. 467–471, 1985.

ODOM, J. V.; BACH, M.; BRIGELL, M.; et al. ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update). **Documenta Ophthalmologica**, v. 133, n. 1, 2016.

OLIVEIRA, R. C.; MESSIAS, A.; SIQUEIRA, R. C.; et al. Vitreous Pharmacokinetics and

Retinal Safety of Intravitreal Preserved Versus Non-preserved Triamcinolone Acetonide in Rabbit Eyes. **Current Eye Research**, v. 37, n. 1, p. 55–61, 2012.

ONYESOM, I.; LAMPROU, D. A.; SYGELLOU, L.; et al. Sirolimus encapsulated liposomes for cancer therapy: Physicochemical and mechanical characterization of sirolimus distribution within liposome bilayers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 11, p. 4281–4293, 2013.

PAPANGKORN, K.; PRENDERGAST, E.; HIGUCHI, J. W.; BRAR, B.; HIGUCHI, W. I. Noninvasive Ocular Drug Delivery System of Dexamethasone Sodium Phosphate in the Treatment of Experimental Uveitis Rabbit. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 9, p. 1–10, 2017.

PEPPLE, K. L.; ROTKIS, L.; GROL, J. VAN; et al. Cytokine Characterization of a Model of Uveitis in Rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 13, p. 8438–8448, 2015.

PERRY, I.; NEUBERGER, J. Immunosuppression: Towards a logical approach in liver transplantation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 139, n. 1, p. 2–10, 2005.

PETERS, T.; KIM, S.-W.; CASTRO, V.; et al. Evaluation of polyesteramide (PEA) and polyester (PLGA) microspheres as intravitreal drug delivery systems in albino rats. **Biomaterials**, v. 124, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961217300741>>. .

PEYNSHAERT, K.; DEVOLDERE, J.; SMEDT, S. C. DE; REMAUT, K. In vitro and ex vivo models to study drug delivery barriers in the posterior segment of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 126, p. 44–57, 2018.

PHILLIPS, B. N.; WROBLEWSKI, K. J. A retrospective review of oral low-dose sirolimus (rapamycin) for the treatment of active uveitis. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v. 1, n. 1, p. 29–34, 2011.

PLEYER, U.; THURAU, S. R. Sirolimus for the treatment of noninfectious uveitis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 17, n. 1, p. 127–35, 2016. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84955500539&partnerID=tZOtx3y1>>. .

PLEYER, U.; THURAU, S. R.; PLEYER, U.; THURAU, S. R. Expert Opinion on Pharmacotherapy Sirolimus for the treatment of noninfectious uveitis Sirolimus for the treatment of noninfectious uveitis. , v. 6566, n. February, 2016.

PRETE, M.; DAMMACCO, R.; FATONE, M. C.; RACANELLI, V. Autoimmune uveitis: clinical, pathogenetic, and therapeutic features. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 16, n. 2, p. 125–136, 2016.

PRIYANKA, J. B. Review Article Biologicals in uveitis One of the most important and difficult challenges to confront. **Journal of Clinical Ophthalmology and Research**, v. 3, p. 3–10, 2017.

RATAY, M. L.; BELLOTTI, E.; GOTTARDI, R.; LITTLE, S. R. Modern Therapeutic Approaches for Noninfectious Ocular Diseases Involving Inflammation. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 23, p. 1700733, 2017.

RIM, T. H.; KIM, S. S.; HAM, D.; et al. Incidence and prevalence of uveitis in South Korea : a nationwide cohort study. **British Journal of Ophthalmology**, v. 102, n. 1, p. 79–83, 2017.

ROBERGE, F. G.; XU, D.; CHAN, C. C.; et al. Treatment of autoimmune uveoretinitis in the rat with rapamycin, an inhibitor of lymphocyte growth factor signal transduction. **Curr Eye Res**, v. 12, n. 2, p. 197–203, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8449029>. .

ROBINSON, M. R.; BAFFI, J.; YUAN, P.; et al. Safety and pharmacokinetics of intravitreal 2-methoxyestradiol implants in normal rabbit and pharmacodynamics in a rat model of choroidal neovascularization. **Experimental eye research**, v. 74, n. 2, p. 309–17, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950241>>. .

ROBSON, A. G.; NILSSON, J.; LI, S.; et al. ISCEV STANDARDS ISCEV guide to visual electrodiagnostic procedures. **Documenta Ophthalmologica**, p. 1–26, 2018.

ROMANO, M. F.; AVELLINO, R.; PETRELLA, A.; et al. Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF- κ B/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 2829–2836, 2004.

RONG, X.; YUAN, W.; LU, Y.; MO, X. Safety evaluation of poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactic-acid) microspheres through intravitreal injection in rabbits. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3057–3068, 2014.

ROUF, M. A.; VURAL, I.; RENOIR, J. M.; HINCAL, A. A. Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. **Journal of Liposome Research**, v. 19, n. 4, p. 322–331, 2009.

SEHGAL, S. N. of Action Immunosuppressive Effect Results From Blockade of Signal Transduction and Inhibition of Cell Cycle Progression. **Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 335–340, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912098000459>>. .

SEHGAL, S. N. Sirolimus: Its discovery, biological properties, and mechanism of action. **Transplantation Proceedings**, v. 35, n. 3 SUPPL., 2003.

SEN, H. N.; LARSON, T. A.; MELETH, A. D.; SMITH, W. M.; NUSSENBLATT, R. B. Subconjunctival sirolimus for the treatment of chronic active anterior uveitis: Results of a pilot trial. **American Journal of Ophthalmology**, v. 153, n. 6, p. 1038–1042, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2011.12.018>>. .

SÈVE, P.; CACOUB, P.; BODAGHI, B.; et al. Autoimmunity Reviews Uveitis : Diagnostic work-up . A literature review and recommendations from an expert committee. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, p. 1254–1264, 2017.

SHANMUGANATHAN, V. A. The efficacy of sirolimus in the treatment of patients with refractory uveitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 89, n. 6, p. 666–669, 2005. Disponível em: <<http://bjo.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjo.2004.048199>>. .

SHATZ, W.; AARONSON, J.; YOHE, S.; KELLEY, R. F.; KALIA, Y. N. Strategies for modifying drug residence time and ocular bioavailability to decrease treatment frequency for

back of the eye diseases. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 1, p. 43–57, 2019.

SHI, W.; GAO, H.; XIE, L.; WANG, S. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, n. 8, p. 3339–3344, 2006.

SILVA, G. R.; ALMEIDA, A. P. R.; FERNANDES-CUNHA, G. M.; et al. Safety and in vivo release of fluconazole-loaded implants in rabbits' eyes. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 35, p. 323–326, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2016.08.009>>. .

SILVA, G. R. DA; FIALHO, S. L.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; CUNHA-JÚNIOR, A. DA S. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 585–595, 2010.

SILVA, L. M. P. DA; MUCCIOLI, C.; OLIVEIRA, F. DE; et al. Visual impairment from uveitis in a reference hospital of Southeast Brazil: a retrospective review over a twenty years period^ien; Deficiência visual em uveítes em hospital de referência da região sudeste do Brasil: uma revisão retrospectiva de 20 anos^ip. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 76, n. 6, p. 366–369, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492013000600010>. .

SIMAMORA, P.; ALVAREZ, J. M.; YALKOWSKY, S. H. Solubilization of rapamycin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, n. 1–2, p. 25–29, 2001.

SIMONINI, G.; CANTARINI, L.; BRESCI, C.; et al. Autoimmunity Reviews Current therapeutic approaches to autoimmune chronic uveitis in children. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 10, p. 674–683, 2010.

SMET, M. D. DE; TAYLOR, S. R. J.; BODAGHI, B.; et al. Understanding uveitis: The impact of research on visual outcomes. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 30, n. 6, p. 452–470, 2011.

SOLANO, A. G. R.; PEREIRA, A. DE F.; FARIA, L. G. A. DE; et al. Etoposide-Loaded Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) Intravitreal Implants : In Vitro and In Vivo Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1652–1661, 2018. AAPS PharmSciTech.

SOUZA, M. C. M.; FIALHO, S. L.; SOUZA, P. A. F.; et al. Tacrolimus-loaded PLGA implants: In vivo release and ocular toxicity. **Current Eye Research**, v. 39, n. 1, p. 99–102, 2014.

STAHL, A.; PASCHEK, L.; MARTIN, G.; et al. Rapamycin reduces VEGF expression in retinal pigment epithelium (RPE) and inhibits RPE-induced sprouting angiogenesis in vitro. **FEBS Letters**, v. 582, n. 20, p. 3097–3102, 2008.

SUBRIZI, A.; AMO, E. M. DEL; KORZHIKOV-VLAKH, V.; et al. Design principles of ocular drug delivery systems: importance of drug payload, release rate, and material properties. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, 2019.

SUN, M.; SI, L.; ZHAI, X.; et al. The influence of co-solvents on the stability and bioavailability of rapamycin formulated in self-microemulsifying drug delivery systems. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 37, n. 8, p. 986–994, 2011.

TALAT, L.; ISMETOVA, F.; LIGHTMAN, S.; TOMKINS-NETZER, O. Treatment of Uveitis with Intraocular Steroids. **Intravitreal Steroids**. p.81–90, 2015. Springer.

TAYLOR, P. J.; JOHNSON, A. G. Quantitative analysis of sirolimus (Rapamycin) in blood by high- performance liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 718, p. 251–257, 1998.

TERADA, N.; LUCAS, J. J.; SZEPESEI, A.; et al. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 154, n. 1, p. 7–15, 1993.

THE STANDARDIZATION OF UVEITIS NOMENCLATURE (SUN) WORKING GROUP. Standardization of Uveitis Nomenclature for Reporting Clinical Data. Results of the First International Workshop. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, n. 3, p. 509–516, 2005.

THORNE, J. E.; SUHLER, E.; SKUP, M.; et al. Prevalence of Noninfectious Uveitis in the United States. **JAMA ophthalmology**, v. 134, n. 11, p. 1237–1245, 2016.

THRIMAWITHANA, T. R.; YOUNG, S.; BUNT, C. R.; GREEN, C.; ALANY, R. G. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 5, p. 270–277, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.12.004>>. .

TOURI, K.; BELGUENDOUZ, H.; MEDJEER, O.; et al. Propolis modulates NOS2/arginase-1 pathway in tropomyosin-induced experimental autoimmune uveitis. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 1293–1303, 2018.

TSIROUKI, T.; DASTIRIDOU, A.; SYMEONIDIS, C.; et al. A Focus on the Epidemiology of Uveitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 26, n. 1, p. 2–16, 2018.

TSZYRSZNIC, W.; BOROWIEC, A.; PAWLOWSKA, E.; et al. Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 9–15, 2013.

VALLOCHI, A. L.; COMMODARO, A. G.; SCHWARTZMAN, J. P.; BELFORT, R.; RIZZO, L. V. The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 1–2, p. 135–141, 2007.

WANG, S.; WANG, M.; LIU, Y.; et al. Effect of Rapamycin Microspheres in Sjögren Syndrome Dry Eye : Preparation and Outcomes. **Ocular Immunology and Inflammation**, p. 1–8, 2018. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09273948.2018.1527369>>. .

WONG, G. K.; GRIFFITH, S.; KOJIMA, I.; DEMAINE, A. L. Antifungal Activities of Rapamycin and Its Derivatives, Prolylrapamycin, 32-Desmethyrapamycin, and 32-Desmethoxyrapamycin. , v. 51, n. 5, 1998.

WU, W.; HE, Z.; ZHANG, Z.; et al. Intravitreal injection of rapamycin-loaded polymeric micelles for inhibition of ocular inflammation in rat model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 238–246, 2016.

YAN, Z.; BAI, Y.; TIAN, Z.; et al. Anti-proliferation effects of Sirolimus sustained delivery

film in rabbit glaucoma filtration surgery. **Molecular vision**, v. 17, p. 2495–2506, 2011.

YASIN, M. N.; SVIRSKIS, D.; SEYFODDIN, A.; RUPENTHAL, I. D. Implants for drug delivery to the posterior segment of the eye: A focus on stimuli-responsive and tunable release systems. **Journal of Controlled Release**, v. 196, p. 208–221, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.030>>. .

YATSCOFF, R. W.; WANG, P.; CHAN, K.; HICKS, D.; ZIMMERMAN, J. Rapamycin: Distribution, Pharmacokinetics, and Therapeutic Range Investigations. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 17, n. 6, p. 666–671, 1995.

YU, X.; ZHANG, R.; LEI, L.; SONG, Q.; LI, X. High drug payload nanoparticles formed from dexamethasone-peptide conjugates for the treatment of endotoxin-induced uveitis in rabbit. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 591–603, 2019.

YUAN, X. B.; YUAN, Y. B.; JIANG, W.; et al. Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1–2, p. 241–248, 2008.

ZHANG, L.; LI, Y.; ZHANG, C.; WANG, Y.; SONG, C. Pharmacokinetics and tolerance study of intravitreal injection of dexamethasone-loaded nanoparticles in rabbits. **International journal of nanomedicine**, v. 4, p. 175–183, 2009.

ZHAO, C.; ZHANG, M. Immunosuppressive Treatment of Non-infectious Uveitis: History and Current Choices. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 32, n. 1, p. 48–61, 2017.

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

ANEXOS

ANEXO I – Certificado de aprovação do projeto para testes *in vivo* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais.

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 4 / 2016, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE DE SISTEMAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO SIROLIMUS EM MODELO DE UVEÍTE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL”, que tem como responsável Armando da Silva Cunha Junior, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/04/2016. Este certificado espira-se em 05/04/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 4 / 2016, related to the Project entitled “EVALUATION OF THE SAFETY AND ACTIVITY OF BIODEGRADABLE SYSTEMS CONTAINING SIROLIMUS IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE UVEITIS MODEL”, under the supervision of Armando da Silva Cunha Junior, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/04/2016. This certificate expires in 05/04/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 05/04/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II – Resultados do Capítulo II publicado no periódico *Documenta Ophthalmologica*.

Author's personal copy

Doc Ophthalmol
https://doi.org/10.1007/s10633-018-9664-8



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Toxicity and in vivo release profile of sirolimus from implants into the vitreous of rabbits' eyes

Mayara Rodrigues Brandão De Paiva · Nayara Almeida Lage · Maria Carolina Andrade Guerra · Marcos Paulo Gomes Mol · Marcela Coelho Silva Ribeiro · Gustavo De Oliveira Fulgêncio · Dawidson A. Gomes · Isabela Da Costa César · Sílvia Ligório Fialho · Armando Silva-Cunha

Received: 23 August 2018 / Accepted: 6 November 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose To assess the in vivo release profile and the retinal toxicity of a poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) sustained-release sirolimus (SRL) intravitreal implant in normal rabbit eyes.

Methods PLGA intravitreal implants containing or not SRL were prepared, and the viability of ARPE-19 and hES-RPE human retinal cell lines was examined after 24 and 72 h of exposure to implants. New Zealand rabbits were randomly divided into two groups that received intravitreal implants containing or not SRL. At each time point (1–8 weeks), four animals from the SRL group were euthanized, the vitreous was collected, and drug concentration was calculated. Clinical evaluation of the eyes was

performed weekly for 8 weeks after administration. Electroretinography (ERG) was recorded in other eight animals, four for each group, at baseline and at 24 h, 1, 4, 6, and 8 weeks after the injection. ERG was carried out using scotopic and photopic protocols. The safety of the implants was assessed using statistical analysis of the ERG parameters (a and b waves, a and b implicit time, B/A ratio, oscillatory potential, and Naka–Rushton analysis) comparing the functional integrity of the retina between the PLGA and SRL-PLGA groups. After the last electrophysiological assessment, the rabbits were euthanized and retinal histopathology was realized.

Results After 24 and 72 h of incubation with PLGA or SRL-PLGA implants, ARPE-19 and hES-RPE cells showed viability over 70%. The maximum concentration of SRL (199.8 ng/mL) released from the device occurred within 4 weeks. No toxic effects of the implants or increase in the intraocular pressure was observed through clinical evaluation of the eye. ERG responses showed no significant difference between the eyes that received PLGA or SRL-PLGA implants at baseline and throughout the 8 weeks of follow-up. No remarkable difference in retinal histopathology was detected in rabbit eyes treated with PLGA or SRL-PLGA implants.

Conclusions Intravitreal PLGA or SRL-PLGA implants caused no significant reduction in cell viability and showed no evident toxic effect on the function or structure of the retina of the animals. SRL

Sílvia Ligório Fialho and Armando Silva-Cunha are joint senior authors.

M. R. B. De Paiva · N. A. Lage · M. C. S. Ribeiro · G. D. O. Fulgêncio · I. Da Costa César · A. Silva-Cunha
Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte CEP 31270-901, Brazil

M. C. A. Guerra · M. P. G. Mol · S. L. Fialho (✉)
Pharmaceutical Research and Development, Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte CEP 30510-010, Brazil
e-mail: silvia.fialho@funed.mg.gov.br

D. A. Gomes
Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil

Published online: 19 November 2018

Springer

ANEXO III – The ABCF Young Investigator Award 2018

CERTIFICATE

We certify that **Mayara Rodrigues Brandão de Paiva** was the winner of the ABCF Young Investigator Award 2018 with the work **“Toxicity of sirolimus**

intravitreal implants in normal rabbit eyes”, co-authorship by **Marcela Coelho Silva Ribeiro**¹, **Gustavo Oliveira Fulgêncio**¹, **Sílvia Ligório Fialho**²,

Armando Silva Cunha Júnior¹, presented at IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.


 Maria José Soares Mendes Giannini
 President Congress


 Teresa Dalla Costa
 President ABCF



IV ABCF
CONGRESS

ABCF - 2018

BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care

September 06 to 08, 2018

CENTRO FECOMÉRCIO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

ANEXO IV – Ofício de aprovação do projeto para testes *in vivo* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Ezequiel Dias.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da segurança e atividade de sistemas biodegradáveis contendo sirolimus em modelo de uveíte autoimune experimental**", registrada com o nº 112/2017, sob a responsabilidade de **Sílvia Ligório Fialho** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, em reunião de 20/09/2017

Finalidade	Pesquisa/
Vigência da autorização	27/09/2017 a 27/09/2018
Espécie/linhagem/raça	Coelhos Nova Zelândia
Nº de animais	24 animais
Peso/Idade	2 a 2,5 kg /2 a 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-FUNED o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa ou até **27 de Outubro de 2018**.

Belo Horizonte, 27 de Setembro de 2017.

Heloisa Helena Marques Oliveira
Coordenadora da CEUA/Funed