

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de Farmácia**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

Lorena Carla Vieira

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS DE  
APLICAÇÃO SUPRACOROIDAL CONSTITUÍDOS DE POLIURETANO PARA O  
TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OCULARES**

Belo Horizonte

2015

Lorena Carla Vieira

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS DE  
APLICAÇÃO SUPRACOROIDAL CONSTITUÍDO DE POLIURETANO PARA O  
TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OCULARES**

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

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Belo Horizonte

2015

V658d Vieira, Lorena Carla.  
Desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos de aplicação supracoroidal constituído de poliuretano para o tratamento de inflamações oculares [recurso eletrônico] / Lorena Carla Vieira. – 2015.  
1 recurso online (116 f. : il.) : pdf.

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Oftalmologia – Teses. 2. Olhos – Doenças – Teses. 3. Polímeros – Teses. 4. Corticosteroides – Teses. 5. Fármacos – Teses. 6. Uveíte – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 617.7



## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA LORENA CARLA VIEIRA

Realizou-se, no dia dois de outubro de 2015, às 14 horas, na sala 3062 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, a 98ª defesa de tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, intitulada "Desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos de aplicação supracoroidal constituídos de poliuretano para o tratamento de inflamações oculares", apresentada por LORENA CARLA VIEIRA, número de registro 2011744533, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Armando da Silva Cunha Junior - Orientador (UFMG), Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos (UFMG), Prof. Rubens Camargo Siqueira (USP- Rib. Preto), Dra. Sílvia Ligório Fialho (FUNED) e Prof. Renes de Resende Machado (UFMG).

A Comissão considerou a tese apresentada pela discente:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, segue assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 02 de outubro de 2015.

Eduardo Moreira de Castro - Secretário

Prof. Armando da Silva Cunha Junior (Doutor)

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos (Doutor)

Prof. Rubens Camargo Siqueira (Doutor)

Sílvia Ligório Fialho (Doutora)

Prof. Renes de Resende Machado (Doutor)

Dedico este trabalho ao Fernando pelo amor e apoio em todos os momentos, e à minha avó Irene, que eu tanto amava cujo sofrimento causado pelas complicações do glaucoma me impulsionou ainda mais na realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me guiou e me deu forças para trilhar esse longo caminho e não desistir nos momentos difíceis.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior pela confiança, incentivo, amizade, pelos ensinamentos valiosos e por todas as oportunidades maravilhosas que me deu.

Aos meus pais que tanto amo, Moacir e Zizinha, que me ensinaram e me deram tudo de mais valioso que há no mundo, pelo amor e apoio em todos os momentos, dizendo para que eu confiasse em Deus e que tudo iria dar certo.

Aos meus irmãos Adriane, Priscila e Diego, pela amizade e carinho. À Ana Luísa pelos sorrisos que alegram os meus dias.

Ao Fernando, meu amor, meu marido, meu amigo, obrigada por todo o carinho, por entender as minhas ausências...pela compreensão, amor e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu avô João, que tanta falta faz, que me ensinou que devemos sempre sorrir e seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela amizade e grande apoio nos experimentos, além de aliviarem a pressão do dia a dia com os momentos de descontração. A todos os professores do LTF pelo apoio.

À Professora Francine Behar-Cohen pela confiança e por me receber em seu laboratório em Paris. À Min por toda ajuda, ensinamentos e amizade. À Brigitte pelo carinho. À todos da equipe 17 pela amizade.

À Gabi, Juliana, Ana Elisa e Talita por toda ajuda neste trabalho e por fazerem os meus dias em Paris mais felizes!

Às amigas do laboratório, que tornam os dias de trabalho muito mais felizes, Mayara, Marcela, Michelle, Dani e Luísa.

A todos que estiveram presentes na minha vida e que de alguma forma me auxiliaram neste trabalho.

A todas as pessoas que sofrem com problemas oftálmicos, que de alguma forma esse trabalho e os outros do nosso grupo ajudem a diminuir o seu sofrimento.

## RESUMO

O tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho é limitado uma vez que as formas convencionais de administração de fármacos falham ao disponibilizar doses terapêuticas no vítreo, retina e coróide. Injeções intravítreas vêm sendo utilizadas, porém, são uma técnica invasiva que apresenta diversos riscos. Os implantes biodegradáveis são capazes de disponibilizar o fármaco diretamente nos tecidos oculares em doses terapêuticas e por um período prolongado. Os poliuretanos (PUD) são polímeros sintéticos biodegradáveis amplamente utilizados em sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade, propriedades físicas e mecânicas ajustáveis de acordo com a necessidade e síntese livre de solventes orgânicos, o que reduz a toxicidade. Neste trabalho, filmes de PUD (dispersão aquosa de poliuretano) e dexametasona (DX), um dos corticosteroides mais utilizados no tratamento da uveíte, foram desenvolvidos e caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), além de ter sido determinado o perfil de liberação *in vitro* do fármaco. Também foram avaliadas a biocompatibilidade e a eficácia do sistema em modelo animal de uveíte anterior aguda EIU (*endotoxin-induced uveitis*). Os resultados obtidos mostram que foi possível obter filmes de PUD contendo várias concentrações de DX, por meio de métodos reprodutíveis e que permitiram a disponibilização do fármaco presente nas matrizes poliméricas na sua forma biologicamente ativa. Os sistemas foram inseridos com sucesso no espaço supracoroidal de olhos de ratos, apresentando biocompatibilidade e segurança em testes *in vivo*. O filme biodegradável de PUD contendo a DX foi capaz de liberar doses efetivas do fármaco, inibindo a resposta inflamatória característica da uveíte anterior por meio da diminuição da expressão de fatores pró-inflamatórios e aumento na expressão de fatores anti-inflamatórios, além da redução do número de células inflamatórias e desativação de monócitos e células da microglia, tornando-se um sistema promissor no tratamento de doenças inflamatórias oculares.

Palavras-chave: dexametasona; poliuretanos biodegradáveis; implantes intraoculares; espaço supracoroidal; uveíte.

## ABSTRACT

The treatment of diseases of the posterior segment of the eye is limited once the conventional forms of drug administration fail to provide therapeutic levels drug to the vitreous, retina and choroids. Intravitreal injections have been used to deliver drugs to the posterior segment of the eye, but it is an invasive technique with a lot of potential risks. The biodegradable implants are able to release drugs directly to the vitreous and to maintain long-term vitreous concentration of drugs in therapeutic range. The polyurethanes (PUD) are biodegradable synthetic polymers widely used in drug delivery systems due to their biocompatibility, adjustable mechanical and physics properties according to the necessity and synthesis free of organic solvents, reducing toxicity. In this work, PUD (polyurethane aqueous dispersion) films and dexamethasone (DX), one of the most widely used corticosteroids in the treatment of uveites, were developed and characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the long-term *in vitro* release profile was determined. Biocompatibility and effectiveness of the system were assessed in an animal model of acute anterior uveites EIU (endotoxin-induced uveites). The results show that it was possible to obtain PUD films containing different concentrations of DX, by reproducible methods that provide drug in dispersed and active form in the polymeric matrix. The systems were successfully implanted in suprachoroidal space, showing biocompatibility and safety at *in vivo* tests. PUD biodegradable film containing DX was able to deliver effective doses of the drug in ocular tissues, inhibiting the characteristic inflammatory response of anterior uveites by downregulating the expression of pro-inflammatory factors and increasing expression of anti-inflammatory factors, while reducing the number of inflammatory cells and the monocytes/microglial cells activation, becoming a promising system for the treatment of ocular inflammatory diseases.

Keywords: dexamethasone; biodegradable polyurethanes; intraocular implants; suprachoroidal space; uveitis.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema anatômico do bulbo do olho. ....	20
Figura 2 - Corte transversal do olho, evidenciando as estruturas da câmara anterior, íris, corpo ciliar e cristalino. ....	22
Figura 3 - Regiões do corpo ciliar: Pars plana e pars plicata.....	23
Figura 4 - Estrutura e organização da retina. (A) Corte histológico da retina. (B) Esquema da organização celular da retina. EPR: epitélio pigmentado da retina; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; CNI: camada nuclear interna; CPI: camada plexiforme interna; CCG: camada de células ganglionares.....	26
Figura 5 - Esquema das principais funções do epitélio pigmentado da retina. Adaptado de: (Strauss, 2005). ....	28
Figura 6 - Esquema representativo da BHR. As junções de oclusão presentes entre as células do EPR e também entre as células endoteliais dos capilares da retina limitam a passagem de moléculas da circulação sanguínea para o segmento posterior do olho. ....	30
Figura 7 – Representação esquemática do filme lacrimal. ....	32
Figura 8 – Córnea como uma barreira à absorção de fármacos pela via tópica. Fonte: Mitra (2010). ....	33
Figura 9 - Rotas de administração ocular de fármacos. Adaptado de: ....	35
Figura 10 - Reação de formação do poliuretano. ....	40
Figura 11 - Estruturas químicas dos diisocianatos mais comumente utilizados na síntese de poliuretanos. ....	42
Figura 12 - Esquema da reação de extensão de cadeia a partir de pré-polímeros com um diol de baixa massa molar (A) e uma amina (B). C) Estrutura de alguns extensores de cadeia comumente utilizados. Adaptado de: (Rocha et al. 2013).....	43
Figura 13 - Mecanismos de degradação do poliuretano e estruturas dos produtos de degradação. Adaptado de: (Cherng et al. 2013). ....	46
Figura 14 - Estruturas que compõem a úvea: íris, corpo ciliar e coroide. ....	49
Figura 15 - Classificação anatômica das uveítes: anterior, intermediária e posterior. ....	50
Figura 16 - Patogênese da uveíte. Um desequilíbrio entre os mecanismos regulatórios e inflamatórios contribui para a uveíte. A combinação de causas ambientais e fatores de risco	

genéticos levam ao aumento de fatores inflamatórios, ocasionando ou levando à cronicidade da uveíte. Treg = células T regulatórias.....	53
Figura 17 - Representação esquemática do local de implantação do Retisert. Disponível em: <a href="http://www.retinalphysician.com/">http://www.retinalphysician.com/</a> .....	56
Figura 18 - Representação esquemática da inserção do Ozurdex na cavidade vítrea. ....	57
Figura 19 - Esquema de reações da síntese e dispersão aquosa do poliuretano em água. Fonte: (Ayres 2006). ....	66
Figura 20 – ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C) .....	72
Figura 21 – Transformação do MTT em formazan pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células vivas.....	73
Figura 22 - Injeção subcutânea de 100 µL de solução salina contendo 200 µg de LPS para a indução da uveíte induzida por endotoxina (EIU).....	77
Figura 23 – Comparação dos sistemas utilizados para a realização da PCR em tempo real. ....	82
Figura 24 – Filmes de poliuretano contendo dexametasona (30%). Barra = 5 mm .....	85
Figura 25 - Espectros de absorção no infravermelho de amostras de PUD após o estudo de degradação <i>in vitro</i> : a) PUD após 2 meses de degradação; b) PUD após 20 dias de degradação; c) filme de PUD após 2 meses de degradação d) filme de PUD não degradado. ....	88
Figura 26 - Espectro de absorção no infravermelho de amostras de PUD contendo DX em diferentes concentrações: a) PUD DX 8%; b) PUD DX 20%; c) PUD DX 30%; d) DX pura; e) filme de PUD branco.....	90
Figura 27 - Perfil de liberação de DX a partir dos filmes de PUD contendo 8, 20 e 30% do fármaco (n=6). A) Concentração de DX em função do tempo (mg/mL); B) Liberação acumulada (%). ....	91
Figura 28 - Validação da técnica de inserção do filme polimérico. (A) Filme de PUD e DX que foi implantado; (B) Ausência de hemorragia após inserção cirúrgica dos filmes nos olhos de ratos Lewis; (C) etapas da cirurgia: incisão na esclera e coróide, inserção do filme entre a coróide e a retina, localização do filme após a sua completa inserção; (D) Imagem da tomografia de coerência óptica (OCT) mostrando a localização do filme no espaço supracoroideano, sem danos aos tecidos adjacentes.....	95
Figura 29 - A) Cortes histológicos dos olhos de ratos Lewis após 15 dias da implantação do filme PUD DX 30% no espaço supracoroideano, barra = 350 µm e 140 µm; B) Imagem da	

retina, evidenciando a integridade de suas camadas. CNI: camada nuclear interna; CPE: camada plexiforme externa; CNE: camada nuclear externa; SI/SE: segmentos internos e externos; EPR: epitélio pigmentado da retina. ....	97
Figura 31 - Avaliação clínica dos animais submetidos à indução da uveíte anterior pela injeção subcutânea de LPS (EIU). EIU: grupo controle; EIU PUD: grupo implantado com PUD sem fármaco; EIU PUD DX: grupo implantado com PUD contendo 30% de DX.....	99
Figura 32 - A) Contagem de células inflamatórias na região do corpo ciliar e íris; B) Cortes histológicos evidenciando as células inflamatórias. Coloração azul de toluidina. Teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. *** $p < 0.001$ , $n = 6$ . Barra = 43,5 $\mu\text{m}$ . ....	100
Figura 33 – (A) Marcação de macrófagos via anticorpo secundário anti-ED1 (verde); contraste de núcleos em azul (DAPI); (B) Contagem de células ED-1 positivas na região do corpo ciliar e íris. Barra = 20 $\mu\text{m}$ . ....	102
Figura 34 – Marcação de microglia e macrófagos com anti-IBA1 e anti-NOS2. Observa-se que a maioria das células IBA1 positivas nos grupos EIU e PUD branco apresentam formato arredondado, ou seja, estão ativadas, ao contrário das células do grupo PUD DX que apresentam forma ramificada (não ativadas). A expressão de NOS-2 pelas células IBA1 positivas também foi avaliada pela co-marcação com anti-NOS2. Observa-se no detalhe, que a DX reduziu a expressão de NOS2 pela microglia. As setas indicam as áreas da co-marcação (pontos alaranjados), presentes nos grupos sem DX. Barra = 20 $\mu\text{m}$ . ....	103
Figura 35 – Análise da expressão de mRNAs de IL-6, IL-23, IL-1 $\beta$ , NOS-2 e IL-10, ocludina, VEGF e CINC-1 determinadas por PCR em tempo real de células do corpo ciliar e da retina de animais do grupo controle e dos grupos PUD e PUD DX. Teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pos-teste de Dunn. *** $p < 0.001$ , $n = 5$ . ....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação anatômica das uveítes.....	51
Tabela 2 – Estruturas químicas dos materiais utilizados na síntese da dispersão aquosa de poliuretano.....	63
Tabela 3 - Características da dexametasona utilizada no preparo dos implantes de poliuretano.....	64
Tabela 4 - Graduação da inflamação ocular de acordo com a avaliação clínica.....	78
Tabela 5 – Primers utilizados no PCR em tempo real.....	81
Tabela 6 - Composição da dispersão aquosa de poliuretano.....	84
Tabela 7 – Principais bandas de absorção na região do infravermelho características de poliuretanos.....	86
Tabela 8 – Principais bandas de absorção na região do infravermelho características da dexametasona.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARPE-19	Células do epitélio pigmentado da retina
BHA	Barreira hemato-aquosa
BHR	Barreira hemato-retiniana
CCG	Camada de células ganglionares
CLE	Camada limitante externa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
CNV	Neovascularização coroidal
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
EPR	Epitélio pigmentar da retina
FDA	Food and Drug Administration
FR	Fotorreceptores
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IL-8	Interleucina 8
NOS2	Óxido nítrico sintase 2
Min	Minuto
PBS	Tampão fosfato pH 7,4
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Poli(etileno glicol)
PGA	Poli(glicólico)
PLA	Poli(D,L-láctico)
PLGA	Poli(D,L-láctico-glicólico)
PMMA	Polimetil metacrilato
POE	Poli(orto-éster)
PU	Poliuretano
PUD	Dispersão aquosa do poliuretano 6

PVA	Álcool polivinílico
Tg	Transição vítrea
Tr	Tempo de retenção
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1 ANATOMIA OCULAR</b> .....	21
1.1 Córnea .....	22
1.2 Esclera .....	22
1.3 Cristalino .....	23
1.4 Íris .....	24
1.5 Corpo ciliar .....	24
1.6 Coróide .....	25
1.7 Humor aquoso .....	25
1.8 Corpo vítreo .....	26
1.9 Retina .....	26
1.10 Barreiras hemato-oculares .....	29
<b>2 LIMITAÇÕES NA ADMINISTRAÇÃO OFTÁLMICA DE FÁRMACOS</b> .....	32
2.1 Administração tópica .....	32
2.2 Administração sistêmica .....	35
2.3 Administração periocular .....	35
2.4 Administração intravítrea .....	36
<b>3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACOS</b> .....	38
3.1 Sistemas de transporte de fármacos .....	38
3.2 Sistemas poliméricos .....	39
3.3 Poliuretanos .....	41
3.4 Poliuretanos na oftalmologia .....	47
<b>4 UVEÍTE</b> .....	50
4.1 Patogênese da uveíte .....	52

4.2 Tratamento.....	54
<b><u>4.2.1 Injeções intravítreas de corticosteróides</u></b> .....	55
<b><u>4.2.2 Imunossuppressores</u></b> .....	56
<b><u>4.2.3 Implantes não biodegradáveis</u></b> .....	56
<b><u>4.2.4 Implantes biodegradáveis</u></b> .....	57
JUSTIFICATIVA.....	59
5 OBJETIVOS.....	61
5.1 Objetivo geral.....	62
5.2 Objetivos específicos.....	62
MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
6 MATERIAIS.....	64
7 MÉTODOS.....	66
7.1 Síntese da dispersão aquosa de poliuretano.....	66
7.2 Preparo dos filmes de poliuretano e dexametasona.....	71
7.3 Estudo de degradação <i>in vitro</i> do poliuretano.....	71
7.4 Caracterização dos implantes de PUD e DX.....	71
7.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	72
7.6 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos produtos de degradação dos implantes de PUD contendo dexametasona.....	73
7.7 Animais.....	75
7.8 Inserção dos sistemas no espaço supracoroidal.....	75
7.9 Estudo da biocompatibilidade <i>in vivo</i> dos filmes de PUD e PUD DX.....	76
<b><u>7.9.1 Avaliação histopatológica</u></b> .....	76
7.10 Estudo da atividade anti-inflamatória dos filmes de PUD DX em modelo animal de uveíte - Modelo EIU ( <i>endotoxin-induced uveitis</i> ).....	77
7.11 Avaliação da resposta inflamatória.....	78
<b><u>7.11.1 Avaliação clínica</u></b> .....	79
<b><u>7.11.2 Avaliação histopatológica</u></b> .....	79



<u>7.11.3 Contagem das células inflamatórias</u> .....	80
<u>7.11.4 Análise imunohistoquímica</u> .....	80
<u>7.11.5 Contagem das células ED1 positivas</u> .....	81
<u>7.11.6 PCR em tempo real</u> .....	81
7.12 Análises estatísticas .....	83
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	84
8.1 Síntese da dispersão aquosa de poliuretano (PUD).....	84
8.2 Preparação dos filmes de poliuretano e dexametasona .....	85
8.3 Caracterização dos implantes de PUD branco e PUD-DX.....	86
8.4 Teste de liberação .....	91
8.5 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos produtos de degradação dos implantes de PUD contendo dexametasona .....	94
8.6 Inserção dos sistemas no espaço supracoroidal.....	95
8.7 Estudo da biocompatibilidade <i>in vivo</i> dos filmes de PUD e PUD-DX .....	97
8.8 Estudo da atividade anti-inflamatória dos filmes de PUD DX em modelo animal de uveíte - Modelo EIU ( <i>endotoxin-induced uveitis</i> ) .....	99
<u>8.8.1 Avaliação da resposta inflamatória</u> .....	99
<u>8.8.2 Análise imunohistoquímica</u> .....	102
<u>8.8.3 PCR em tempo real</u> .....	105
9 CONCLUSÃO .....	110
10 PERSPECTIVAS.....	111
BIBLIOGRAFIA .....	112

# INTRODUÇÃO

---

As inflamações oculares que acometem principalmente a úvea, são doenças oculares graves responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível no mundo. A uveíte acomete principalmente indivíduos na idade socioeconomicamente ativa, sendo o impacto econômico e social causado por elas devido às complicações que encurtam a vida produtiva dos indivíduos, piorando a sua qualidade de vida e onerando os serviços de saúde pública.

Esse cenário, portanto, estimula o desenvolvimento de novos tratamentos para a uveíte e outras doenças inflamatórias oculares. A eficácia do tratamento depende, basicamente, do sucesso no transporte de doses efetivas de agentes farmacológicos diretamente para os locais a serem tratados. Entretanto, as barreiras naturais do olho, constituídas pela córnea, esclera e as barreiras hemato-oculares (barreira hemato aquosa e hematorretiniana) promovem uma baixa penetração dos fármacos no interior do olho limitando os tratamentos disponíveis e exigindo cuidado devido a possíveis ocorrências de efeitos adversos.

Visando a manutenção de níveis terapêuticos adequados nos tecidos oculares, em particular, no corpo ciliar, íris, retina e coróide, sistemas de liberação prolongada de fármacos tem sido desenvolvidos. Tais sistemas proporcionam inúmeras vantagens, como aumento da biodisponibilidade; liberação prolongada; redução de efeitos adversos sistêmicos e a frequência de injeções intravítreas, reduzindo as suas complicações e aumentando o conforto e a adesão do paciente ao tratamento.

Nos últimos anos os poliuretanos biodegradáveis contendo, por exemplo, segmentos de poli- $\epsilon$ -caprolactona, tem sido utilizados em dispositivos biomédicos, implantes para reparação tecidual e em sistemas de liberação de fármacos graças à sua biocompatibilidade, flexibilidade mecânica, síntese livre de solventes orgânicos e reduzido efeito tóxico *in vivo*.

O espaço supracoroidal, situado entre a esclera e a coróide, tem sido usado sem reações locais adversas como local para a liberação de fármacos para o segmento posterior do olho. As vantagens deste espaço incluem o fato dos fármacos não necessitarem passar pela barreira escleral e serem liberados diretamente na coróide e potencialmente na retina, sem a necessidade da inserção na cavidade vítrea.

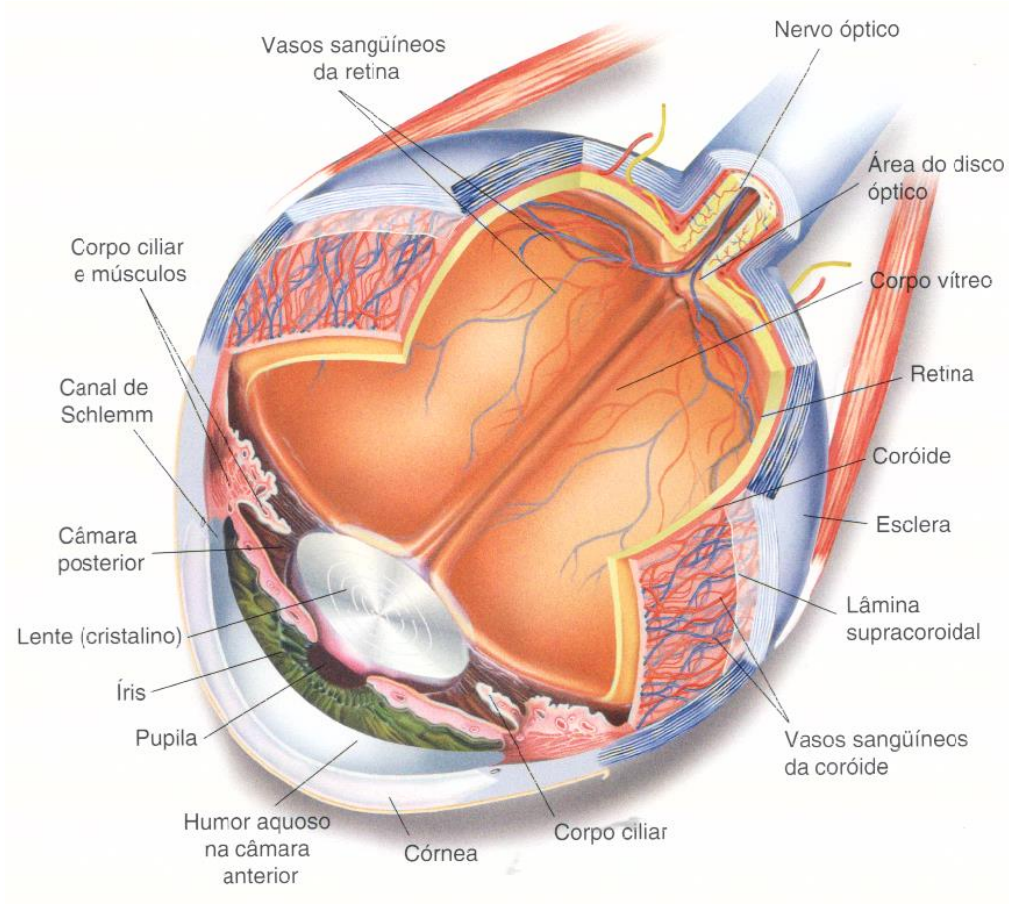
Neste trabalho, dispersões aquosas de poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis foram sintetizadas a fim de se incorporar a dexametasona, um dos corticosteroides mais utilizados no tratamento da uveíte. Os filmes obtidos foram então avaliados quanto à biocompatibilidade e eficácia *in vivo* em modelo de uveíte animal, visando a utilização destes no tratamento de doenças inflamatórias oculares.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 1 ANATOMIA OCULAR

O bulbo ocular encontra-se situado em uma cavidade óssea, a órbita, cuja principal função é a sua proteção. Ele é formado por estruturas que compõem os segmentos anterior e posterior do olho (Figura 1). O segmento anterior é constituído pela íris, cristalino, córnea, humor aquoso e esclera, sendo que esta última circunda todo o bulbo do olho. O segmento posterior compreende o corpo vítreo, a retina, coróide, o nervo óptico e também a esclera (Kim *et al.*, 2014; Kimura e Ogura, 2001; Yasukawa *et al.*, 2004).



**Figura 1 - Esquema anatômico do bulbo do olho.**

(Disponível em: <http://drmarciovargas.site.med.br/>)

Os anexos do bulbo ocular são constituídos pelas pálpebras, pelo sistema lacrimal, além dos cílios e sobrancelhas, que tem como função a proteção do olho.

O bulbo do olho é formado por três camadas ou túnicas que recobrem os meios transparentes por onde a luz passa antes de atingir a retina, sendo denominadas de túnica fibrosa ou externa (córnea e esclera); túnica vascular ou intermediária (úvea, ou seja, íris, corpo ciliar e coróide), tendo como principal função o fornecimento de nutrientes e o carreamento de metabólitos para fora do olho; e túnica nervosa ou interna (retina), onde os fotorreceptores transformam a energia luminosa em sinais nervosos, os quais são transmitidos para o cérebro pelo nervo óptico (Kim *et al.*, 2014; Bron *et al.*, 1997).

### **1.1 Córnea**

A córnea é constituída por um tipo especial de tecido conjuntivo denso que se encontra disposto na forma lamelar, em uma estrutura unicamente modificada para transmitir e refratar a luz, assim como proteger o olho de corpos estranhos. Ela é formada por cinco camadas: o epitélio, camada de Bowman, estroma (mais espessa), membrana de Descemet e endotélio (camada única de células hexagonais). É avascular, sendo que os nutrientes difundem para o tecido a partir dos vasos do limbo, pelo filme lacrimal ou pelo humor aquoso. A sua transparência é inerente ao arranjo das fibras de colágeno presentes no estroma e ao seu relativo estado de desidratação, mantido pelo bombeamento contínuo de íons pelo endotélio em direção à câmara anterior (Morrison, 2014; Lloyd *et al.*, 2001).

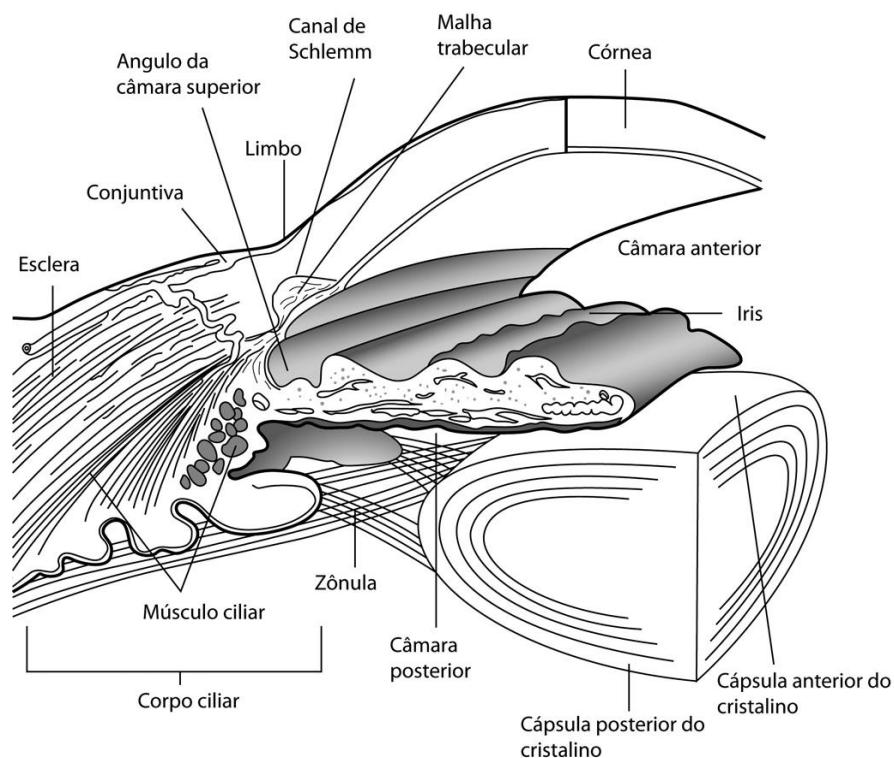
### **1.2 Esclera**

A esclera, formada principalmente por fibras colágenas, se estende do segmento anterior ao posterior. Apesar de ser fina, com espessura máxima de 1 mm, serve de suporte para a inserção dos músculos extraoculares, além de conferir forma e

firmeza ao bulbo ocular, mantendo-se estável durante variações da pressão intraocular e movimentos do olho. As fibras do nervo óptico atravessam a esclera, através de uma área posterior desta estrutura denominada lâmina cribrosa (Watson e Young, 2004).

### 1.3 Cristalino

O cristalino ou lente é uma estrutura transparente e biconvexa situada posteriormente à íris e ligada ao corpo ciliar por meio do ligamento suspensor (Figura 2). É formado por uma massa de células alongadas, chamadas fibras cristalínicas, compactadas e envoltas por uma cápsula elástica capaz de se deformar e acomodar, possibilitando a refração da luz (Kim *et al.*, 2014; Lloyd *et al.*, 2001).



**Figura 2 - Corte transversal do olho, evidenciando as estruturas da câmara anterior, íris, corpo ciliar e cristalino.**

(Disponível em: <http://oftalmologiausp.com.br/graduacao.html>)

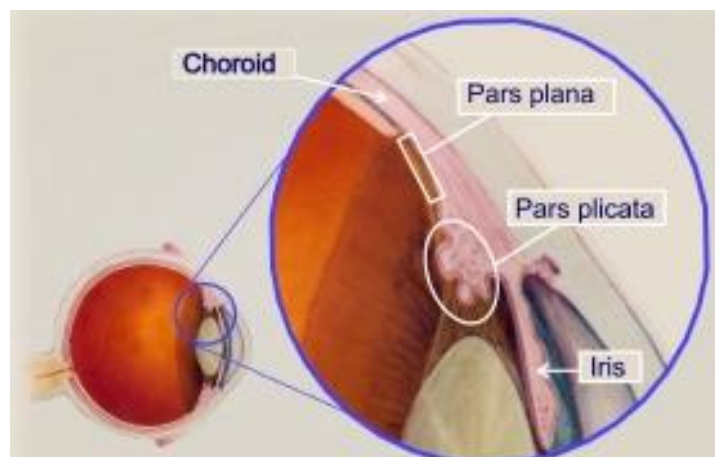


## 1.4 Íris

A íris é a porção colorida do olho, formada por tecido conjuntivo contendo fibras musculares, vasos sanguíneos e células pigmentares. Em seu centro há uma abertura, a pupila, pela qual a íris controla a entrada de luz na retina através da contração autonômica de fibras musculares lisas radiais em resposta à variação da luminosidade, reduzindo assim possíveis lesões intraoculares (Coca-Prados, 2014).

## 1.5 Corpo ciliar

O corpo ciliar é uma estrutura especializada situada entre a íris e a coróide, responsável pelo fornecimento de nutrientes à córnea e ao cristalino, além da remoção de catabólitos por meio do humor aquoso produzido pelas células dos processos ciliares. Ele é ligado ao cristalino pela zônula, sendo que a contração de fibras musculares presentes no músculo ciliar leva à acomodação da lente, alterando o foco para a visão de perto ou de longe. O corpo ciliar pode ser dividido em duas partes, a pars plicata (anterior) e a pars plana (posterior). A região posterior do corpo ciliar une-se à retina através da ora serrata (Coca-Prados, 2014; Bron *et al.*, 1997).



**Figura 3 - Regiões do corpo ciliar: Pars plana e pars plicata.**

(Disponível em: <http://www.uveitis.org/>)

## 1.6 Coróide

A coróide está localizada entre a esclera (camada externa) e a retina (camada interna), que se estende do corpo ciliar ao nervo óptico. Ela é mais espessa na região posterior e se torna gradualmente mais fina ao se aproximar da região anterior. Encontra-se firmemente ligada à esclera, na região do nervo óptico, onde as artérias ciliares posteriores e os nervos ciliares penetram no olho. A coróide provê nutrientes e oxigênio às células da retina, através da sua rede de capilares fenestrados e permeáveis. A retina e a coróide são separadas pela membrana de Bruch (Bousquet *et al.*, 2015; Lloyd *et al.*, 2001).

### *Espaço supracoroidal*

O espaço supracoroidal é um espaço virtual existente entre a coróide e a esclera. Em condições normais, o volume de líquido presente neste espaço é inferior a 10  $\mu$ L. Quando este é preenchido por líquido de exsudação ou sangue torna-se real, sendo limitado anteriormente pelo esporão escleral e posteriormente pelo nervo óptico. Entretanto, existem pontos de aderência nos vários vasos e nervos que penetram o tecido uveal a partir da esclera (Rai *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2014; Marback *et al.*, 2009).

## 1.7 Humor aquoso

O humor aquoso é secretado pelos processos do corpo ciliar e flui da câmara posterior, atravessa a pupila e chega à câmara anterior, espaço entre a córnea e a lente. Sua composição é estritamente regulada para excluir proteínas de alto peso molecular e células, contendo glicose, oxigênio e aminoácidos. Juntamente com o corpo vítreo, desempenha um papel importante na manutenção da pressão intraocular (Lloyd *et al.*, 2001).

## 1.8 Corpo vítreo

A recepção dos raios luminosos pela retina é permitida pelo corpo vítreo, estrutura gelatinosa, transparente e incolor localizada na câmara vítrea. Representa cerca de 80% do volume ocular, sendo constituído por 98% de água, além de ácido hialurônico, aminoácidos, proteínas solúveis, sais e ácido ascórbico, além de uma rede de fibrilas de colágeno. Seus filamentos proteicos são ordenados tridimensionalmente e carregados negativamente devido à presença do glicosaminoglicano. A sua viscosidade e hidrofilia limita a difusão de moléculas, funcionando como um reservatório.

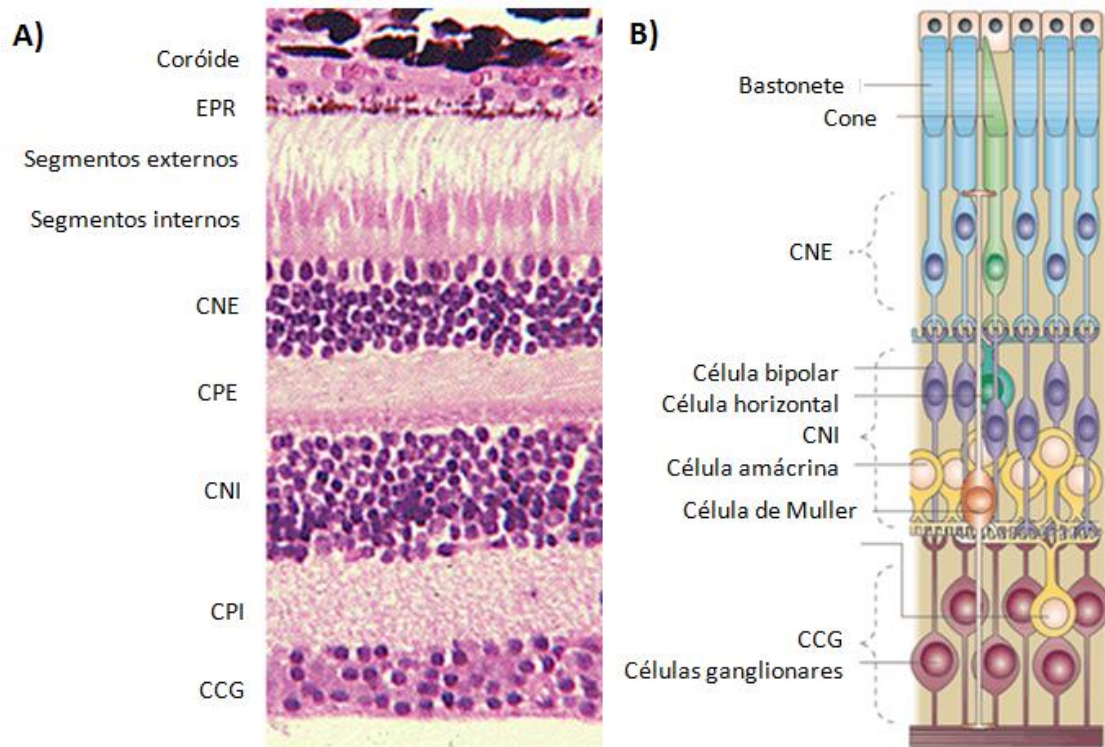
O corpo vítreo está em contato direto com a retina, o corpo ciliar e a porção posterior da lente, e é capaz de promover estabilidade aos componentes posteriores do olho, atenuando o estresse que pode ser gerado à retina devido aos súbitos movimentos (Kaur *et al.*, 2014; Lloyd *et al.*, 2001).

## 1.9 Retina

A retina (Figura 4) é a camada mais interna do segmento posterior do bulbo do olho, e é a estrutura ocular responsável pela captação dos estímulos luminosos, por meio dos fotorreceptores nela presentes. A camada externa da retina encontra-se em contato com a coróide, e a camada interna, com o corpo vítreo. Ela possui duas regiões especiais: a *fóvea centralis* e o ponto cego. A fóvea está no eixo óptico do olho, onde é projetada a imagem do objeto focalizado com grande nitidez. É a região da retina especializada para a visão de alta resolução. A fóvea contém apenas cones e permite que a luz atinja os fotorreceptores sem passar pelas demais camadas da retina, maximizando a acuidade visual (Hoon *et al.*, 2014; Behar-Cohen *et al.*, 2009).

Funcionalmente, a retina é constituída de duas partes, a neuroretina (retina sensorial) e a camada de células do epitélio pigmentado da retina (EPR), e classicamente, sob a luz da microscopia óptica, é composta por 10 camadas:

- camada limitante interna;
- camada de fibras nervosas;
- camada de células ganglionares (CCG);
- camada plexiforme interna (CPI);
- camada nuclear interna (CNI);
- camada plexiforme externa (CPE);
- camada nuclear externa (CNE);
- camada limitante externa;
- camada dos segmentos externo e interno (cones e bastonetes);
- camada pigmentar (epitélio pigmentado da retina - EPR).

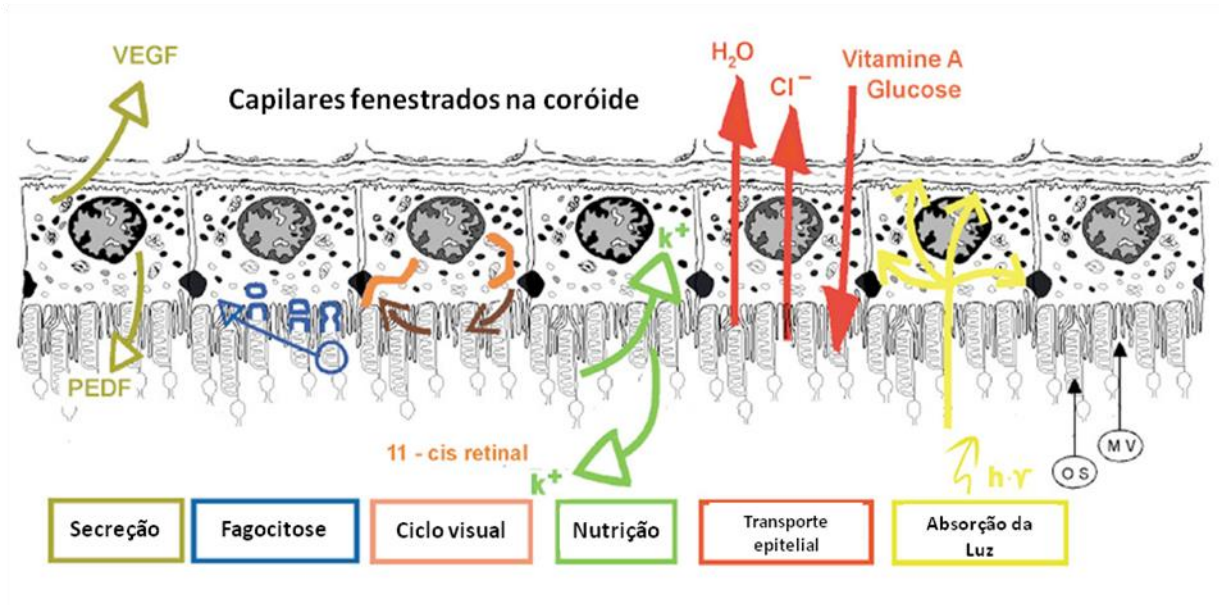


**Figura 4 - Estrutura e organização da retina. (A) Corte histológico da retina. (B) Esquema da organização celular da retina. EPR: epitélio pigmentado da retina; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; CNI: camada nuclear interna; CPI: camada plexiforme interna; CCG: camada de células ganglionares.**

Os bastonetes representam a maior parte da retina neuronal e são responsáveis pela visão periférica, detecção de movimentos e pela visão noturna (escotópica). Já os cones são responsáveis pela visão diurna e de cores (fotópica).

A camada dos segmentos interno e externo é constituída pelas células fotossensíveis da retina, denominadas cones e bastonetes. O segmento externo contém rodopsina e está em contato com as microvilosidades do EPR. A função dos fotorreceptores é converter a energia luminosa em impulso elétrico que será propagado pelas células bipolares e, em seguida, pelas células ganglionares cujos axônios constituem o nervo óptico, transmitindo assim a informação até o córtex visual. Para isso, a CNE, onde se encontram os núcleos dos fotorreceptores (FR), conduz o sinal elétrico até a CPE, onde se encontram junções entre os axônios dos FR e os dendritos das células bipolares. A informação então é transmitida para a CNI, onde se encontram os núcleos das células bipolares, horizontais e amácrinas, além dos capilares dos vasos centrais da retina. A seguir, na CPI ocorre a sinapse entre as células bipolares e as ganglionares, cujos núcleos estão situados na CCG e axônios se agrupam na camada de neurofibras para formar o nervo óptico (Behar-Cohen *et al.*, 2009).

A camada mais externa da retina é o epitélio pigmentado da retina (EPR), o qual está em íntimo contato com os segmentos externos dos fotorreceptores, sendo formado por uma monocamada de células hexagonais. O EPR apresenta funções extremamente importantes, dentre elas pode-se citar o transporte de água, íons e metabólitos do espaço sub-retiniano para o sangue, além de nutrientes como glicose e retinol do sangue para os FR (Figura 5). O EPR também tem como função a fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, reciclando substâncias como o retinal, que são reenviadas a eles para restaurar o ciclo visual. Além disso, secretam fatores de crescimento dos FR e das células endoteliais dos capilares da coróide, e imunossupressores, essenciais na manutenção do privilégio imune do olho (Strauss, 2005).



**Figura 5** - Esquema das principais funções do epitélio pigmentado da retina. Adaptado de: (Strauss, 2005).

### 1.10 Barreiras hemato-oculares

A barreira hemato-ocular separa fisiologicamente o olho do restante do corpo através de componentes epiteliais e endoteliais, protegendo-o da entrada de micro-organismos e células inflamatórias, conferindo um privilégio imune ao olho (Kim *et al.*, 2014). Essa barreira é composta por dois sistemas: a barreira hemato-aquosa (BHA) e a barreira hematorretiniana (BHR) (Al-Halafi, 2014; del Amo e Urtti, 2008).

#### *Barreira hemato-aquosa*

A barreira hemato-aquosa é formada pelo endotélio dos capilares uveais e pelo epitélio não pigmentado ciliar prevenindo a entrada de moléculas na câmara anterior. A íris é composta por um endotélio, uma membrana limitante anterior, um estroma e uma membrana limitante posterior. Fármacos dissolvidos no humor aquoso podem facilmente difundir pela sua superfície porosa, porém, moléculas de

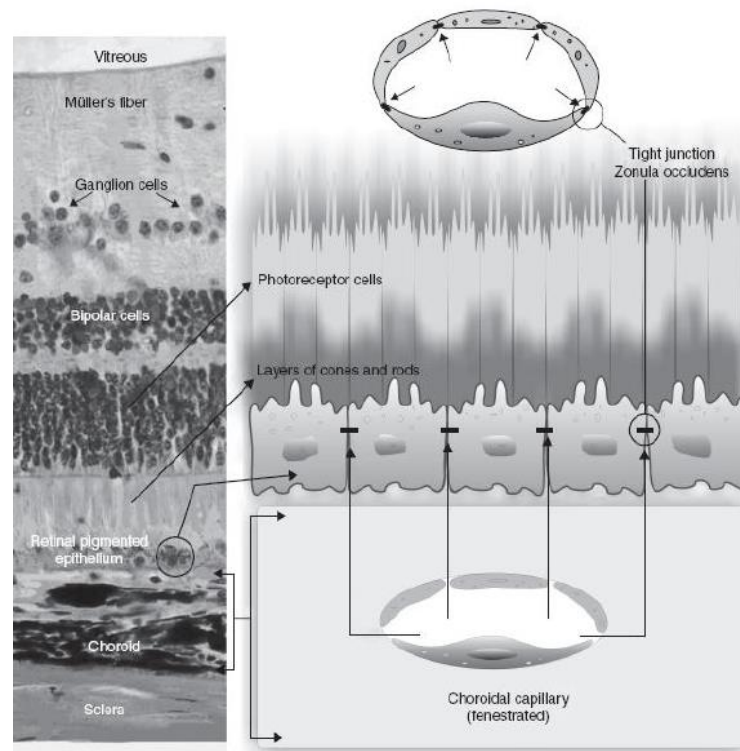
tamanho superior a 40 kDa não difundem pelos seus vasos e permeiam entre as fenestrações dos capilares do corpo ciliar atingindo o humor aquoso (Kim *et al.*, 2014; Hardman e Limbird, 2006).

Já o corpo ciliar é uma estrutura bastante vascularizada de 6 cm<sup>2</sup> de superfície composto por cílios organizados. O epitélio não pigmentado do corpo ciliar é ligado por junções serradas ao epitélio pigmentado e contém células com inúmeras vesículas que garantem a difusão transcelular de moléculas de pequeno tamanho e lipofílicas. As moléculas são eliminadas pelas duas artérias ciliares longas posteriores e duas anteriores presentes (Coca-Prados, 2014; Lloyd *et al.*, 2001).

### *Barreira hematorretiniana*

Juntos, as células endoteliais dos capilares retinianos e o EPR formam a barreira hemato-retiniana (BHR) interna e externa, respectivamente, uma forte barreira contra macromoléculas e leucócitos, fazendo da retina neural um tecido imunologicamente privilegiado e propiciando mecanismos para controlar o fluxo de fluidos e metabólitos (Figura 6). Os vasos da retina são caracterizados por células endoteliais contínuas, não fenestradas e com junções intercelulares impermeáveis, rodeados, em intervalos irregulares, por pericitos e células da micróglia (Strauss, 2005). A interação entre as células endoteliais, chamada de junção de oclusão (*tight junctions*), forma a barreira que permite ao endotélio criar condições para um tecido com integridade funcional, resultando em uma alta resistência elétrica transendotelial e permeabilidade paracelular restrita. A junção intercelular apresenta um pequeno poro (9 a 11nm) que é responsável pelas trocas transcapilares de água e outras moléculas hidrofílicas menores que 15Å (Klaassen *et al.*, 2013).

No EPR as células epiteliais são unidas por meio das zonas de oclusão e de adesão, caracterizadas pela fusão das membranas de células adjacentes. Estas junções são a base da barreira hematorretiniana (BHR) externa, uma vez que impedem a difusão passiva de substâncias dos capilares fenestrados da circulação coroideana à retina neurosensorial (Behar-Cohen *et al.*, 2009).



**Figura 6 - Esquema representativo da BHR. As junções de oclusão presentes entre as células do EPR e também entre as células endoteliais dos capilares da retina limitam a passagem de moléculas da circulação sanguínea para o segmento posterior do olho.**

**Fonte: Mitra (2010).**



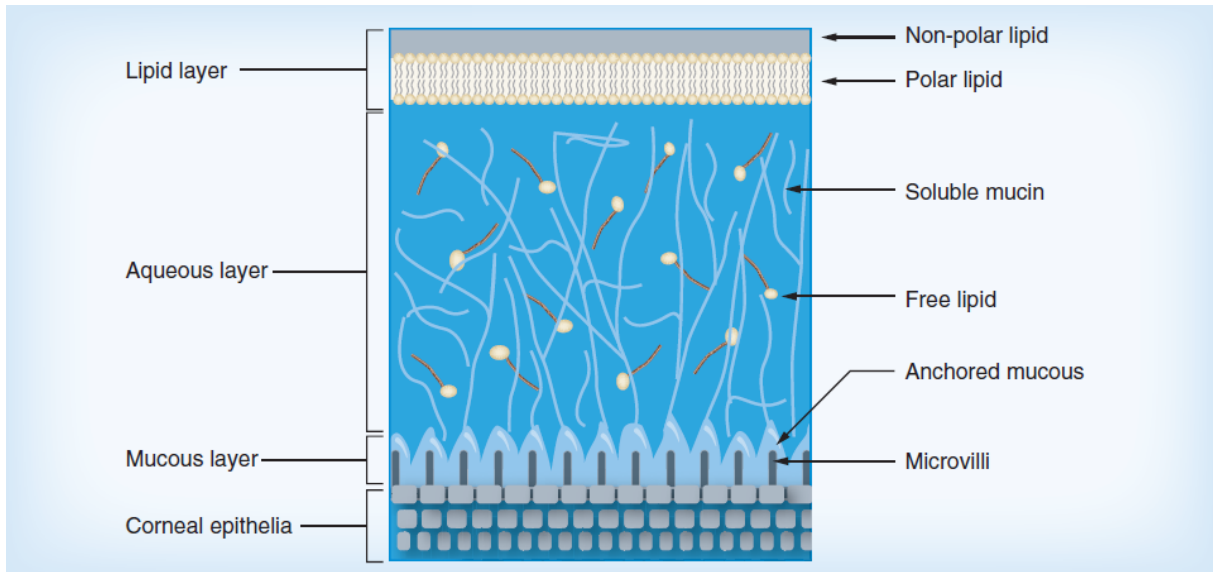
## 2 LIMITAÇÕES NA ADMINISTRAÇÃO OFTÁLMICA DE FÁRMACOS

As características anatômicas e fisiológicas do bulbo do olho são fatores que limitam o tratamento farmacológico de doenças oculares. Essas barreiras normalmente protegem o olho da entrada de agentes tóxicos e micro-organismos, mas também dificultam a penetração de fármacos nos tecidos oculares.

### 2.1 Administração tópica

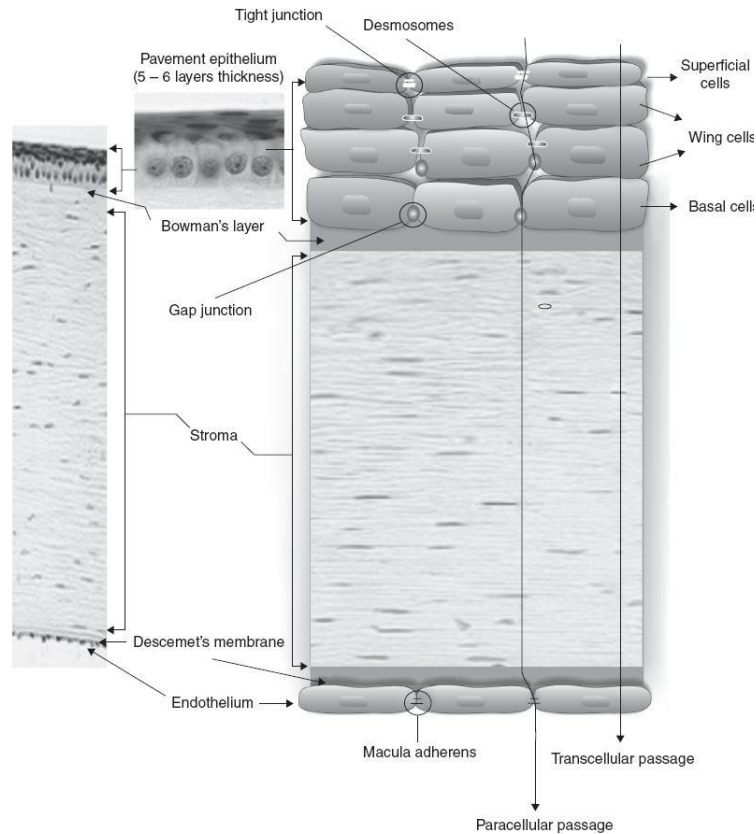
A administração de uma preparação pela via ocular tópica, por meio de colírios, é a mais utilizada em oftalmologia, principalmente quando a doença acomete o segmento anterior do olho. Essa via apresenta maior facilidade de aplicação e comodidade para o paciente, entretanto, as preparações tópicas são, muitas vezes, ineficazes em razão de sua baixa biodisponibilidade devido a fatores pré-corneanos e anatômicos que protegem o olho e, conseqüentemente, limitam a entrada dos fármacos. Tais fatores incluem o filme lacrimal, a drenagem nasolacrimal, o lacrimejamento, a impermeabilidade relativa do epitélio corneano, e as características físico-químicas implícitas ao fármaco (Fialho *et al.*, 2007; del Amo e Urtti, 2008; Eljarrat-Binstock *et al.*, 2010; Gaudana *et al.*, 2010; Yasin *et al.*, 2014).

O filme lacrimal (Figura 7), cuja composição e quantidade são determinantes para uma superfície ocular saudável, oferece a primeira resistência devido à sua alta taxa de renovação reduzindo assim, o tempo de contato do fármaco na superfície ocular.



**Figura 7 - Representação esquemática do filme lacrimal. Adaptado de: (Morrison, 2014).**

Como dito anteriormente, a córnea é constituída por cinco camadas: o epitélio, camada de Bowman, estroma (mais espessa), membrana de Descemet e endotélio (camada única de células hexagonais), sendo o epitélio e o estroma os responsáveis pela considerável impermeabilidade deste tecido (Figura 8). A camada epitelial hidrofóbica constitui uma barreira importante a substâncias hidrofílicas e é formada por cinco ou seis camadas de células. Além disso, a presença de desmossomas e junções ocludentes entre as células epiteliais retarda a permeação de fármacos pelos espaços intercelulares. O estroma constitui aproximadamente 90% da espessura da córnea, forma uma camada hidrofílica e organiza-se singularmente em lamelas de colágeno sintetizado pelos ceratinócitos, sendo seletivo à penetração de moléculas lipofílicas que apresentam certa afinidade pela porção aquosa, expressa pelo coeficiente de partição óleo em água. O endotélio, situado mais posteriormente e formado por uma camada simples de células aderidas entre si por junções estreitas, mantém a integridade da córnea por processos de transporte ativo e funcionam como uma barreira hidrofóbica. Desse modo, a absorção de fármacos pela córnea depende da penetração nas estruturas hidrofílico-hidrofóbicas trilaminares das diversas camadas anatômicas (Hardman and Limbird, 2006; Lee *et al.*, 2010; Gause *et al.*, 2015).



**Figura 8 – Córnea como uma barreira à absorção de fármacos pela via tópica. Fonte: Mitra (2010).**

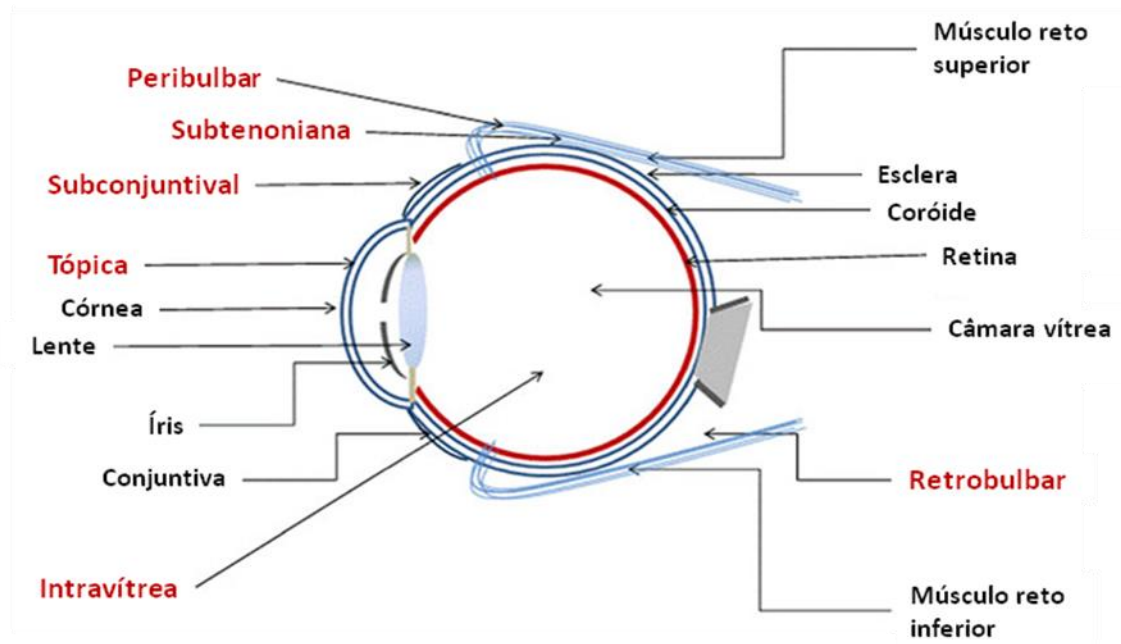
Mecanismos de renovação do humor aquoso e a própria existência de vasos sanguíneos são os principais responsáveis pela eliminação precoce dos fármacos, impossibilitando que seja atingida a dose terapêutica efetiva. Os fármacos são eliminados da câmara anterior pela drenagem do humor aquoso e pela drenagem uveoescleral. Aqueles presentes no humor vítreo são eliminados pela câmara anterior, pela barreira hematorretiniana e pela própria circulação sanguínea. Estima-se que menos de 5% da dose administrada pela via tópica é absorvida e atinge os tecidos intraoculares, o que inviabiliza a utilização desta via no tratamento de doenças do segmento posterior do olho (del Amo e Urtti, 2008).

## 2.2 Administração sistêmica

Os fármacos administrados pela via sistêmica encontram um importante obstáculo anatômico à penetração ocular, a barreira hemato-ocular, que separa fisiologicamente o olho do restante do corpo por componentes epiteliais e endoteliais, cujas junções ocludentes limitam o transporte dos vasos sanguíneos para o olho. A barreira hemato-aquosa, composta pelo endotélio dos capilares uveais e epitélio não pigmentado ciliar, previne a entrada de moléculas na câmara anterior; e a barreira hematorretiniana, formada pelas células endoteliais dos capilares retinianos e pelo EPR, previne a entrada de fármacos no espaço extravascular da retina e no corpo vítreo. Por esta razão, a utilização dessa via na terapêutica ocular requer, geralmente, a administração de doses elevadas visando a manutenção de níveis terapêuticos intravítreos adequados por períodos prolongados, o que pode levar a sérios efeitos adversos, contribuindo assim para a não adesão do paciente ao tratamento (Kim *et al.*, 2014; Thrimawithana *et al.*, 2010; del Amo e Urtti, 2008).

## 2.3 Administração periocular

A via periocular é utilizada no tratamento de doenças do segmento posterior do olho por meio das injeções subconjuntival, subtenoniana, retrobulbar e peribulbar (Figura 9) (Fialho *et al.* 2003). Fármacos administrados por esta via podem atingir o segmento posterior do olho por três diferentes rotas: transescleral, circulação sistêmica pelos vasos coroideanos e absorção pelo epitélio corneano. Dentre estas, a esclera constitui o principal tecido de entrada e algumas de suas características, tais como elevada área de superfície e fácil acesso, alto grau de hidratação e permeabilidade facilitam a administração por meio de injeções perioculares. Os principais riscos relacionados a esta via incluem a perfuração do bulbo ocular, a fibrose dos músculos extra-oculares e a ocorrência de endoftalmite (Eljarrat-Binstock *et al.*, 2010; Gaudana *et al.*, 2010; Yasin *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2015).



**Figura 9** - Rotas de administração ocular de fármacos. Adaptado de: Gaudana *et al.*, 2010.

#### 2.4 Administração intravítrea

A injeção intravítrea constitui uma alternativa à aplicação tópica e sistêmica. Utilizando essa via pode ser evitada a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos proporcionados por vias que não liberam o fármaco no local de ação. No entanto, a distribuição dos fármacos no vítreo não é uniforme: pequenas moléculas se distribuem rapidamente, ao contrário da difusão restrita de moléculas grandes. Além disso, a meia-vida no vítreo é outro fator que pode determinar a eficácia terapêutica, já que o fármaco é eliminado pelas vias anterior e posterior. Assim, devido à rápida eliminação, para que se obtenha uma terapia eficaz, são necessárias múltiplas injeções de forma a manter a concentração do princípio ativo dentro da faixa terapêutica durante um período suficiente. As injeções intravítreas repetidas, no entanto, podem causar sérias complicações, tais como hemorragia intraocular, descolamento de retina, endoftalmite e catarata, além de proporcionar um enorme

desconforto ao paciente (Fialho e Cunha Junior, 2007; Lee *et al.*, 2010; Yasin *et al.*, 2014).

Pesquisas têm sido realizadas a fim de desenvolver sistemas intraoculares de liberação prolongada de fármacos, que permitam liberar concentrações terapêuticas dos fármacos prolongadamente. Tais sistemas proporcionam inúmeras vantagens, como o aumento da biodisponibilidade, liberação prolongada, redução de efeitos adversos sistêmicos e na frequência de injeções intravítreas, reduzindo as suas complicações e aumentando o conforto e a adesão do paciente ao tratamento.

### 3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACOS

Os termos liberação prolongada, lenta ou sustentada são aplicados às formas farmacêuticas desenvolvidas para liberarem o fármaco gradualmente, mantendo a concentração no local de ação dentro de níveis terapêuticos, por período de tempo prolongado. Essas formas farmacêuticas requerem administrações menos frequentes se comparadas às convencionais, aumentando a adesão do paciente ao tratamento.

Diversas tecnologias podem ser empregadas para promover a liberação gradual de um fármaco veiculado em uma forma farmacêutica sólida e a possibilidade de utilização das mesmas em sistemas monolíticos (matriciais) ou multiparticulados (sistemas do tipo reservatório) aumenta a sua versatilidade. Esses sistemas serão posteriormente discutidos.

#### 3.1 Sistemas de transporte de fármacos

O tratamento de doenças do segmento posterior do olho é limitado devido à dificuldade de acesso aos tecidos dessa região; a obtenção de níveis terapêuticos desejáveis, por meio das vias convencionais de administração, é praticamente impossível. A barreira hemato-ocular atua como um mecanismo protetor contra substâncias exógenas, que incluem os fármacos. Sistemas de liberação controlada tornam-se, dessa forma, essenciais para o tratamento de doenças oculares (Herrero-Vanrell *et al.*, 2014; Del Amo e Urtti 2008).

Os materiais poliméricos desempenham um papel importante na taxa de liberação e os do tipo biodegradáveis, principalmente, têm sido extensamente investigados nas últimas décadas para aplicação em sistemas de liberação controlada destinados à via ocular. Esses materiais podem promover um aumento da biodisponibilidade e uma redução de efeitos adversos, desde que a biocompatibilidade do polímero no

olho, que é um importante fator para a aplicação clínica, seja avaliada (Fialho *et al.*, 2003).

Para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho, em que são necessárias administrações intraoculares frequentes, o desenvolvimento de implantes de liberação prolongada de fármacos se torna promissor e constitui um dos campos mais pesquisados em terapêutica oftálmica atualmente (Morrison, 2014).

Implantes preparados a partir de sistemas poliméricos podem ser aplicados em diferentes regiões do olho. Ordenando-se as regiões da mais superficial à mais profunda, temos: região subconjuntival, região subtenoniana, esclera e o interior do bulbo do olho (câmara anterior e corpo vítreo). Em geral, quanto mais profunda a região, mais delicado o procedimento e mais eficaz a concentração do fármaco no vítreo e na retina. Os implantes intravítreos evitam o problema de redução da transparência do meio ocular, observado com a utilização de outros tipos de sistemas aplicados na forma de dispersão, e têm sido investigados para o tratamento de diferentes doenças intraoculares (Herrero-Vanrell *et al.*, 2014; Gaudana *et al.*, 2010).

### **3.2 Sistemas poliméricos**

Os polímeros utilizados nos sistemas de liberação prolongada de fármacos devem ser não-carcinogênicos, hipoalergênicos e não-causadores de resposta inflamatória no local de aplicação (Lloyd *et al.*, 2001). Os implantes poliméricos podem ser de dois tipos: matriciais (ou monolíticos) e reservatórios, e podem ser preparados a partir de diferentes polímeros, os quais podem ser biodegradáveis ou não (Kim *et al.*, 2014; Fialho e Cunha Júnior, 2007).

No sistema matricial, o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz polimérica ou adsorvido na superfície, e a sua liberação ocorre por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. Caso a velocidade de degradação do polímero seja inferior à difusão



do fármaco pela matriz, a liberação inicial dessa é dependente de sua difusão pelo sistema, podendo diferir se ela estiver dissolvida molecularmente ou dispersa no polímero. Quando se utilizam polímeros não-biodegradáveis, a liberação ocorre apenas por um processo de difusão lenta pela matriz. No sistema do tipo reservatório, o fármaco encontra-se em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica, a qual controla sua taxa de liberação. Mudanças na natureza e espessura dessa membrana promovem alterações na velocidade de liberação dos fármacos. Da mesma maneira que no sistema matricial, no sistema reservatório composto por polímeros não-biodegradáveis a liberação do fármaco ocorre apenas por difusão através da membrana (Fialho e Cunha Júnior, 2007).

Sistemas compostos por polímeros não-biodegradáveis, principalmente, os derivados de celulose, silicões, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, embora apresentem uma taxa de liberação relativamente constante, precisam, geralmente, ser removidos posteriormente, o que requer processos cirúrgicos. Já os biodegradáveis podem apresentar vantagens sobre os anteriores, pois são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando de uma remoção posterior, o que proporciona melhor aceitação e adesão do paciente ao tratamento (Lee *et al.*, 2010).

Entre os polímeros classificados como biodegradáveis, encontram-se os poliuretanos, os copolímeros do ácido láctico e glicólico e a poli- $\epsilon$ -caprolactona.

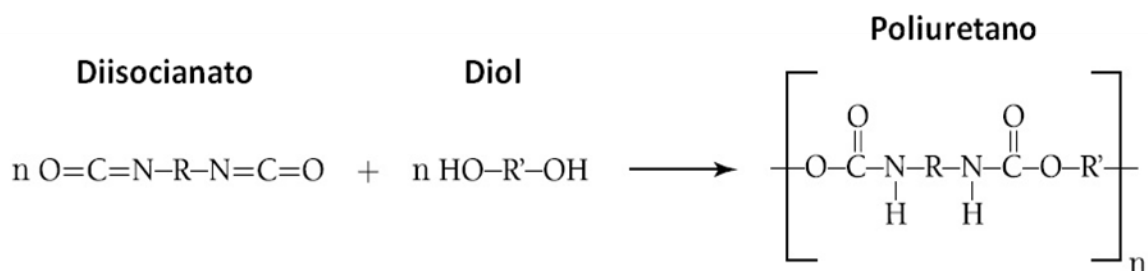
Para que os sistemas poliméricos sejam eliminados do organismo, três principais mecanismos de degradação são descritos (Merkli *et al.*, 1998; Lee, 2015):

- a) **Erosão simples:** este mecanismo está relacionado aos polímeros solúveis em água e que se tornaram insolúveis devido à formação de ligações cruzadas. Desta forma, pode-se dizer que eles são insolúveis em água, mas apresentam uma matriz fortemente hidrofílica. Estes polímeros, portanto, não são adequados para a veiculação de substâncias hidrossolúveis e de baixa massa molar, pois elas se difundem por meio da rede polimérica, independente da velocidade de degradação matricial. Entre os principais polímeros desta categoria, destacam-se a gelatina, o colágeno e o álcool polivinílico;

- b) **Erosão sem clivagem:** mecanismo que ocorre com os polímeros que se tornam hidrossolúveis após reações de hidrólise ou ionização sem alterações significativas na sua massa molar. Por apresentarem dificuldade de eliminação, tais polímeros não podem ser empregados na forma de implantes. O Eudragit® (copolímero do éter metil vinílico e do anidrido maleico - PVM/MA) é um exemplo de polímero que sofre este tipo de erosão;
- c) **Erosão/clivagem:** neste mecanismo, os polímeros são transformados em pequenas e solúveis moléculas pela clivagem de suas cadeias. Durante este processo de degradação eles permitem a liberação da substância ativa. Esse mecanismo é o que está relacionado à definição de biodegradável. Os principais polímeros que sofrem este mecanismo de erosão são os poliésteres (poli-ε-caprolactona, polímeros e copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico), as poliamidas, os poliaminoácidos, os polialquilcianacrilatos, os poliortoésteres e os poliuretanos.

### 3.3 Poliuretanos

Poliuretanos são polímeros que possuem ligações uretano, descobertos por Otto Bayer e colaboradores em 1937. São formados tipicamente por meio da reação de policondensação de um diisocianato com um diol (ou poliol):

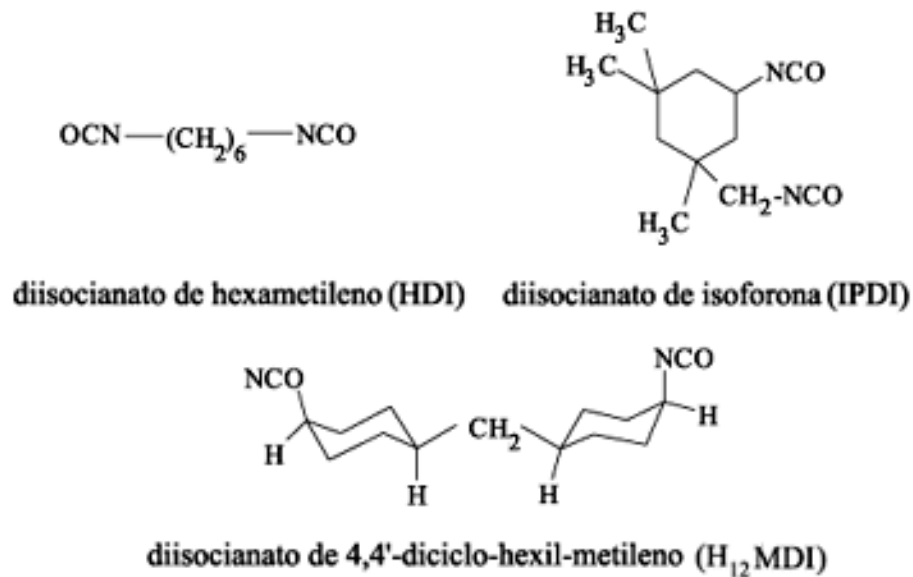


**Figura 10 - Reação de formação do poliuretano.**

As propriedades dos poliuretanos são determinadas por características como a composição da cadeia polimérica, o grau de ramificação ou ligações cruzadas da cadeia e a massa molar do polímero. As principais matérias primas empregadas na síntese desses polímeros são os di ou poliisocianatos e os polímeros hidroxilados de baixa massa molar (polióis), além de agentes de cura, expansão, catalisadores, aditivos e cargas. A escolha dos reagentes a serem utilizados na síntese está relacionada com a finalidade a qual se destina o poliuretano, já que as suas características físicas (aspecto borrachoso – baixa Tg; resinoso ou cristalino) são determinadas, entre outros fatores, pela estrutura da cadeia do diol e do diisocianato (Pinto *et al.*, 2012; Ayres, 2006).

Os polióis utilizados na preparação dos poliuretanos podem ser poliésteres ou poliéteres, tais como a poli- $\epsilon$ -caprolactona e o polietilenoglicol, respectivamente. Os poliésteres são polímeros termoplásticos que apresentam ligações éster em sua constituição química. Os poliéster uretanos são vulneráveis à hidrólise na ligação éster, levando à formação de ácido carboxílico e álcool. Esta instabilidade hidrolítica das ligações éster é uma característica importante no caso de poliuretanos biodegradáveis. Os poliéteres são polímeros que apresentam ligações éter em sua constituição química e são menos vulneráveis a hidrólise do que os poliésteres (Cherng *et al.*, 2013).

Os isocianatos utilizados na síntese podem ser aromáticos ou alifáticos, sendo que os aromáticos geralmente dão origem a PU mais viscosos, e os alifáticos a PU mais flexíveis e resistentes às intempéries. Os monômeros alifáticos mais usados são o hexametileno diisocianato (HDI), o isoforona diisocianato (IPDI) e o 4,4'-diciclohexilmetano diisocianato (H<sub>12</sub>MDI) (Figura 11).

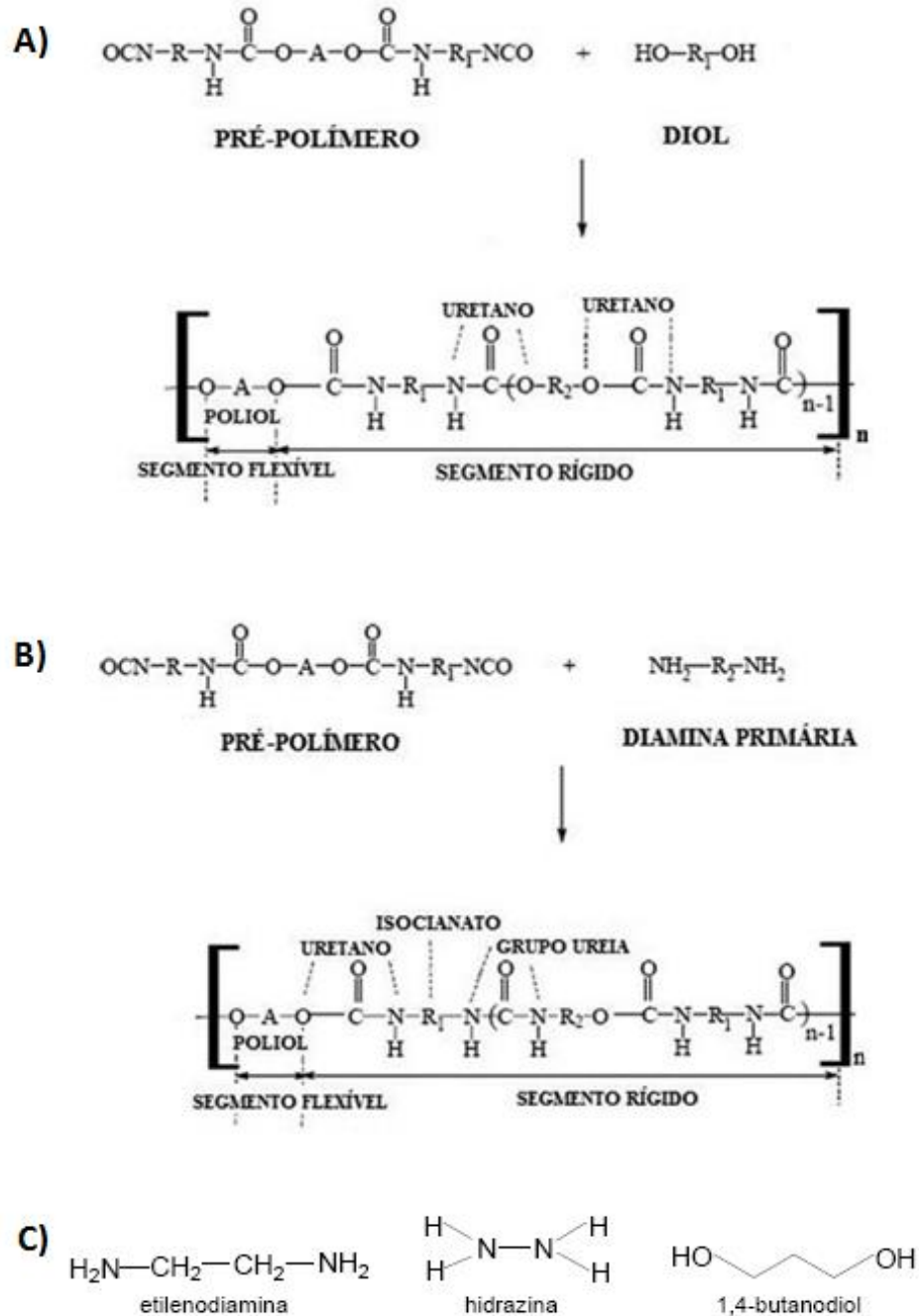


**Figura 11 - Estruturas químicas dos diisocianatos mais comumente utilizados na síntese de poliuretanos.**

Os isocianatos são compostos altamente reativos devido à presença do grupo funcional  $\text{-NCO}$ , ocorrendo reações de adição na dupla ligação  $\text{C=N}$ . A adição com álcoois leva à formação de uretanos e com aminas são formadas ureias. Eles também reagem com a água formando aminas que então reagem com os grupos isocianato formando ureias (Ayres, 2006).

Normalmente, na preparação de resinas de poliuretano usa-se excesso de diisocianato para se obter um pré-polímero com grupos  $\text{-NCO}$  terminais que ficam disponíveis para futuras reações. Isso permite o processo denominado extensão de cadeia, no qual o pré-polímero terminado em  $\text{-NCO}$  reage com um diol de baixa massa molar para formar ligações uretano ou com aminas para formar ligações ureia, onde será produzido um poli(uretano-ureia) que é mais rígido que o homopoliuretano similar (Delpech e Coutinho, 2000). Geralmente os grupos  $\text{NCO}$  residuais são medidos pelo método de titulação com n-butilamina. A concentração de  $\text{NCO}$  residual é importante para a determinação da quantidade de extensor de cadeia a ser adicionado para a reação equimolar com o pré-polímero (Ayres, 2006). Essa extensão de cadeia geralmente é feita após a dispersão do pré-polímero em água, pois de outro modo o pré-polímero de alta viscosidade resultante não poderia

ser disperso. A Figura 12 mostra alguns agentes extensores de cadeia comumente utilizados, assim como um esquema da reação de extensão com dióis e amins.



**Figura 12** - Esquema da reação de extensão de cadeia a partir de pré-polímeros com um diol de baixa massa molar (A) e uma amina (B). C) Estrutura de alguns extensores de cadeia comumente utilizados. Adaptado de: Rocha *et al.*, 2013.

Poliuretanos segmentados podem ser descritos como copolímeros em bloco lineares do tipo (AB)<sub>n</sub>. Um bloco do polímero consiste do diol poliéster ou poliéter flexível de cadeia longa. Esse bloco é usualmente chamado de segmento macio ou segmento flexível, pois incorpora o caráter elastomérico ao polímero. O segundo bloco do copolímero é o segmento rígido, formado pela reação de diisocianatos com extensores de cadeia, ou seja, com dióis ou trióis de baixa massa molar ou diaminas, dando origem a ligações uretano ou uréia que são altamente polares e promovem a coesão do polímero. Os dois tipos de segmentos tendem a uma micro-separação de fases de maneira a formar micro-domínios. Geralmente, a segregação é mais pronunciada com poliéteres que com poliésteres porque a estrutura do éter é menos polar e interage menos com os segmentos mais polares de uretano e ureia (Kim *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2012; Cherng *et al.*, 2013).

#### *Dispersões aquosas de poliuretanos (PUD)*

Geralmente, a síntese dos poliuretanos é feita com o uso de solventes orgânicos, entretanto, a preocupação crescente com o meio ambiente tem levado ao desenvolvimento de produtos com baixa quantidade ou isentos de solventes orgânicos. Além disso, a ausência de solventes é altamente desejável para a aplicação de polímeros como biomateriais, uma vez que resíduos destes que permanecem no polímero após seu processamento podem apresentar alguma toxicidade às células e tecidos vizinhos, além de limitar os agentes farmacologicamente ativos que podem ser incorporados à matriz polimérica, uma vez que os solventes orgânicos poderiam ocasionar a desnaturação dos fármacos que possuem estrutura proteica (Spaans *et al.*, 2000).

No caso dos poliuretanos, obtém-se poliuretanos aquosos (PUD) dispersando-se o poliuretano em água com o auxílio de um emulsificante externo ou por meio da incorporação de grupos promotores de emulsificação na cadeia do poliuretano, produzindo filmes com propriedades superiores. Os grupos emulsificadores podem ser segmentos não iônicos de poliéter ou grupos iônicos. PUDs contendo grupos iônicos são chamados ionômeros e o processo para obtê-los é denominado

processo do pré-polímero. Para inserir os grupos iônicos, chamados de emulsificantes internos, usa-se um composto com as funções álcool e ácido tal como o ácido dimetilolpropiônico (DMPA), sendo que a sua quantidade deve ser alta o suficiente para garantir a estabilidade da dispersão, porém baixa o suficiente para minimizar a sensibilidade do filme curado à água. Para alcançar a solubilidade, os grupos ácidos são neutralizados com compostos básicos, por exemplo, aminas terciárias como a trietilamina (TEA) (Delpech e Coutinho, 2000; Ayres, 2006). Após isso, deve ser feita também a extensão de cadeia para zerar as terminações –NCO da cadeia do polímero.

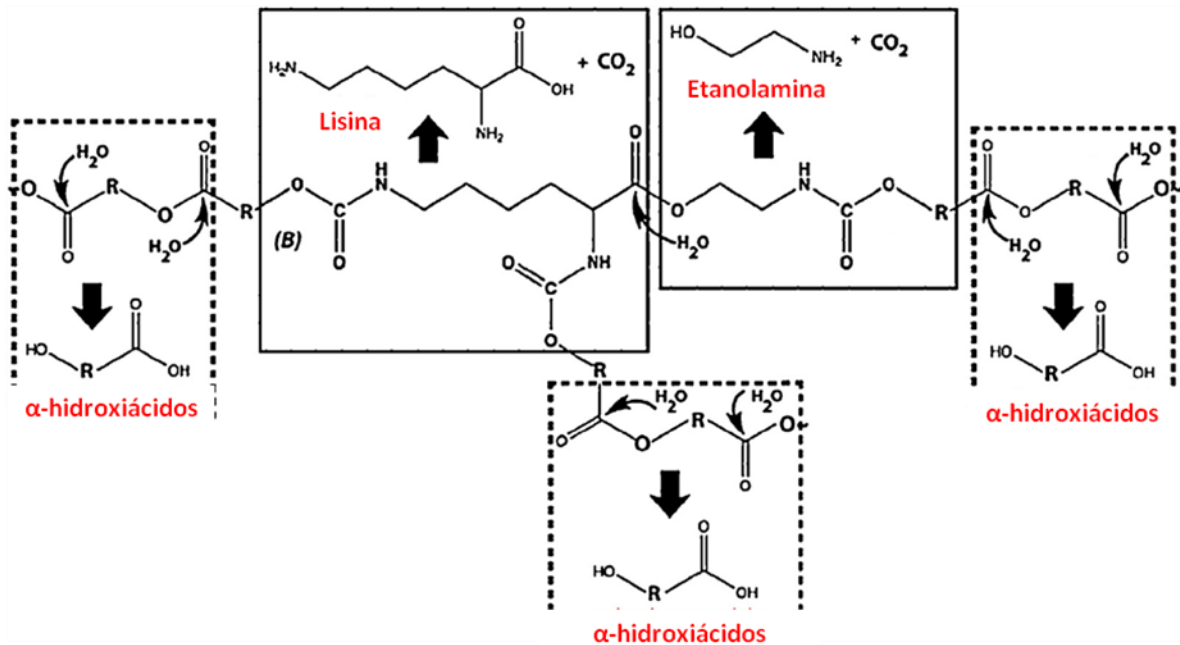
### *Degradação e biocompatibilidade*

PU sintetizados com isocianatos aromáticos apresentam menor biocompatibilidade quando comparados aos PU nos quais foram utilizados diisocianatos alifáticos. Isto deve-se aos produtos de degradação tóxicos, como aminas aromáticas liberadas dos segmentos rígidos do polímero. Devido a isso, a poli- $\epsilon$ -caprolactona é o diol mais utilizado devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (Da Silva *et al.*, 2010).

Os PU são susceptíveis à biodegradação principalmente devido à clivagem de ligações sensíveis à hidrólise presentes nos segmentos flexíveis. Também foi relatada a degradação oxidativa das ligações uretano dos segmentos rígidos. Observou-se que as ligações éster do PU podem ser quebradas por enzimas como, por exemplo, colesterol esterase, carboxil esterase e lipase, levando à formação de  $\alpha$ -hidroxiácidos (Figura 12). Enzimas proteolíticas podem quebrar ligações uretano ou ureia, formando fragmentos de aminas livres ou com grupos hidroxila (Cherng *et al.*, 2013).

A velocidade de degradação dos PU é modulada pelos segmentos flexíveis da cadeia polimérica. As ligações éster são mais susceptíveis à hidrólise que as ligações éter, assim a composição poliéster/poliéter dos segmentos flexíveis é extremamente importante para a velocidade de degradação. PU com segmentos macios hidrofílicos (PEG) apresentam uma maior absorção de água e assim

degradam mais rapidamente que os PU com segmentos macios hidrofóbicos (PCL) (Cherng *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2010).



**Figura 13 - Mecanismos de degradação do poliuretano e estruturas dos produtos de degradação. Adaptado de: Cherng *et al.*, 2013.**

### 3.4 Poliuretanos na oftalmologia

Nos últimos 40 anos, os poliuretanos biodegradáveis e não biodegradáveis, têm sido utilizados em dispositivos biomédicos graças à sua biocompatibilidade e a sua flexibilidade mecânica. PU não biodegradáveis apresentam excelente estabilidade química, resistência à abrasão e propriedades mecânicas, sendo utilizados no desenvolvimento de dispositivos médicos e órgãos artificiais. PU biodegradáveis, contendo, por exemplo, segmentos de poli-ε-caprolactona, são normalmente usados como implantes para a reparação tecidual e em sistemas de liberação de fármacos (Cherng *et al.*, 2013).

Os poliuretanos vêm sendo investigados como suporte para diversos tipos de células, inclusive células de tecidos oculares. William e colaboradores (2005)



estudaram a possibilidade de utilização de poliuretanos não biodegradáveis, comercialmente disponíveis (Pellethane<sup>®</sup>, Tecoflex<sup>®</sup>, Zytar<sup>®</sup>), como suporte de células do epitélio pigmentado da retina, permitindo o estabelecimento de uma monocamada de células do EPR, que seriam posteriormente transplantados no espaço subretiniano. Os resultados obtidos demonstraram que Pellethane<sup>®</sup> e Tecoflex<sup>®</sup> não favoreceram a adesão e proliferação das células RPE, enquanto que sobre o Zytar<sup>®</sup>, as células proliferaram e apresentaram morfologia normal, devido à sua superfície hidrofílica que permite o estabelecimento de interações com as proteínas do soro essenciais para a ancoragem das células. Após o tratamento da superfície dos PU Pellethane<sup>®</sup> e Tecoflex<sup>®</sup> a fim de aumentar a sua hidrofiliidade, as células aderiram e proliferaram, formando uma monocamada de células funcionais (Ayres, 2006).

Da Silva e colaboradores (2009) incorporaram acetato de dexametasona em dispersões aquosas de PU biodegradáveis. Foi observado que a presença do PEG juntamente com a PCL como segmentos flexíveis nos PU biodegradáveis levou ao aumento da taxa de liberação do acetato de dexametasona quando comparado ao PU contendo apenas PCL. O estudo demonstrou que os filmes desenvolvidos promoveram a liberação do fármaco *in vitro* por 53 semanas em uma taxa praticamente constante, sugerindo assim o uso desses filmes no tratamento de uveíte posterior (Da Silva et al. 2009). Em outro trabalho, o mesmo grupo desenvolveu implantes intraoculares para o tratamento da uveíte, sintetizados a partir da incorporação de acetato de dexametasona em um poliuretano biodegradável contendo nanopartículas de argila. Os nanocompósitos de poliuretano contendo PCL como segmento flexível foram obtidos pela inserção de partículas de argila na dispersão aquosa do PU. Foi observado que a presença dessas nanopartículas levou a um aumento da velocidade de liberação do fármaco *in vitro*. A fim de avaliar a biocompatibilidade dos implantes, células do EPR (ARPE-19) foram cultivadas em contato com o PU e os nanocompósitos de PU, e a viabilidade dessas células (avaliada pelo ensaio do MTT após 7 dias) mostrou que não foram liberados componentes tóxicos durante o teste (Da Silva et al., 2011). Também foi avaliado o efeito desses implantes em um modelo de angiogênese inflamatória induzida pelo implante de esponja em camundongos. Os sistemas de liberação de acetato de dexametasona modularam os principais componentes da inflamação,

angiogênese e fibrose no modelo animal. Os resultados obtidos indicaram o uso dos implantes desenvolvidos para a supressão/redução da inflamação e angiogênese em doenças inflamatórias crônicas (Moura *et al.*, 2011).

Gomes e colaboradores (2011) desenvolveram um filme biodegradável de poliuretano e bevacizumabe, anticorpo monoclonal que se liga a todas as isoformas do VEGF, destinado ao tratamento de doenças proliferativas. Este implante foi inserido no espaço subconjuntival de coelhos e testado em um modelo experimental de cirurgia filtrante para glaucoma. O estudo demonstrou que o bevacizumabe foi liberado por um tempo muito pequeno mas, no entanto, foram bem tolerados e promoveram a redução do número de fibroblastos que expressavam VEGF (Paula *et al.*, 2013; Gomes, 2011).

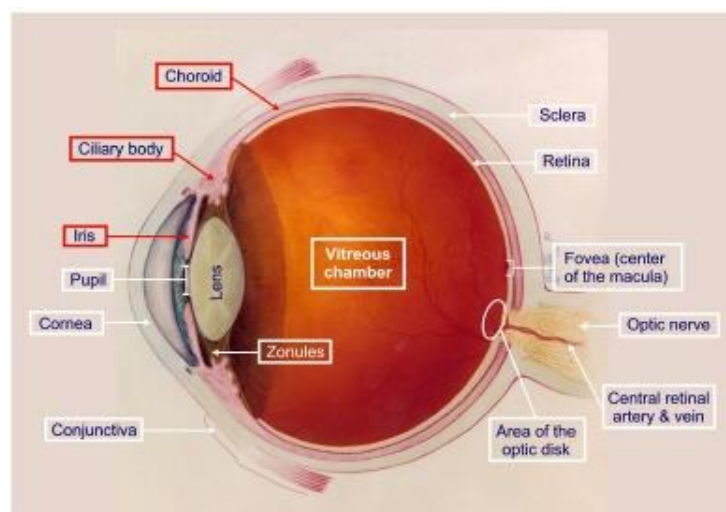
Da Silva e colaboradores (2010) avaliaram a toxicidade em células da retina (ARPE-19) dos produtos de degradação de PU contendo PCL e PEG como cadeias flexíveis após 4 meses de degradação. Não observou-se nenhuma alteração na viabilidade celular assim como nenhum sinal de toxicidade nestes ensaios *in vitro*, sugerindo o uso de PU para aplicações oftálmicas (Da Silva *et al.*, 2010).

## 4 UVEÍTE

O termo uveíte é utilizado para descrever uma série de inflamações oculares que acometem principalmente a úvea (íris, corpo ciliar e coróide), mas estruturas adjacentes como a retina, nervo óptico e esclera, também podem estar envolvidas (Figura 14) (Dunn, 2015). Os sintomas e sinais típicos da uveíte incluem vermelhidão e dor ocular, sensibilidade à luz, visão embaçada e com pequenos pontos que se movimentam, além de perda visual (Moschos *et al.*, 2014).

Estudos mostram que o edema macular é a causa mais frequente de cegueira ou perda visual e que complicações da uveíte, como catarata e glaucoma normalmente ocorrem em mais de metade dos pacientes (Larson *et al.*, 2012).

A uveíte e outras doenças inflamatórias oculares afetam todas as faixas etárias da população, apresentando maior frequência em adultos jovens, com idade média entre 35 a 45 anos, sendo a quarta maior causa de cegueira na população economicamente ativa no mundo desenvolvido, causando 10% a 15% dos casos de cegueira nos EUA e Europa (Yang *et al.* 2013; Lowder *et al.* 2011). Mais de US\$ 240 milhões são gastos anualmente nos EUA em cuidados de saúde e sua consequente morbidade para pacientes com uveíte (De Smet *et al.*, 2011; Dunn, 2015).



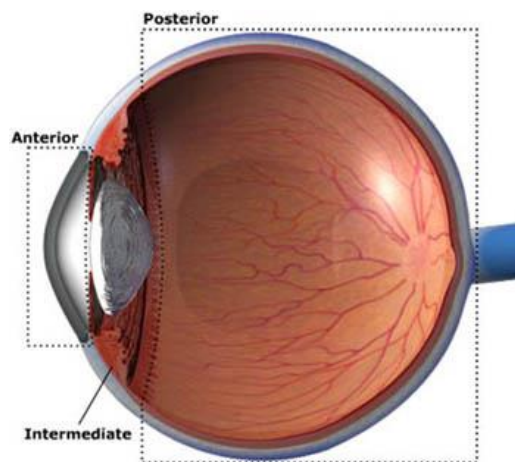
**Figura 14 - Estruturas que compõem a úvea: íris, corpo ciliar e coróide.**

(Disponível em: <http://www.vision-and-eye-health.com/uveitis.html>)

Anatomicamente a uveíte pode ser classificada em anterior, intermediária, posterior e panuveíte (SUN Group, 2005; Dunn, 2015).

Uveíte anterior pode ser definida como uma inflamação localizada principalmente na câmara anterior. Estudos demonstram que ela é a forma mais prevalente de uveíte e que aproximadamente metade dos casos são idiopáticos. Manifesta-se clinicamente por congestão ocular, relacionada ao depósito de células na córnea, seguida de um halo vermelho, de sensação dolorosa, fotofobia, diminuição da visão e lacrimejamento. Em quadros inflamatórios mais graves, surgem precipitados ceráticos e agregados celulares no endotélio da córnea (Yasin *et al.*, 2014; Anesi e Foster, 2011).

Na uveíte intermediária o principal local da inflamação é o vítreo e na uveíte posterior é a retina ou coróide (Tabela 1). Já o termo panuveíte é utilizado nas situações em que não há um sítio inflamatório predominante, mas onde pode ser observada inflamação na câmara anterior, vítreo e retina e/ou coróide, sendo associada aos piores prognósticos, com a formação de catarata, edema macular, glaucoma secundário, opacidade vítrea e descolamento da retina (SUN Group, 2005; Moschos *et al.* 2014).



**Figura 15 - Classificação anômica das uveítes: anterior, intermediária e posterior.**

(Disponível em: <http://dicionariosaude.com/uvea/>)

**Tabela 1 – Classificação anatômica das uveítes**

<b>Tipo</b>	<b>Local principal da inflamação</b>	<b>Inclui</b>
<b>Uveíte anterior</b>	Câmara anterior	Irite Iridociclite Ciclite anterior
<b>Uveíte intermediária</b>	Vítreo	Pars planite Ciclite posterior Hialite
<b>Uveíte posterior</b>	Retina ou coróide	Coroidite focal, multifocal ou difusa Coriorretinite Retinocoroidite Retinite Neurorretinite
<b>Panuveíte</b>	Câmara anterior, vítreo e retina ou coróide	

Adaptado de: (SUN Group, 2005)

Em relação aos fatores etiológicos, as inflamações do trato uveal podem ter causas traumáticas, infecciosas, tumorais e autoimunes. A uveíte pode ocorrer de forma isolada ou associada a outras doenças oculares ou sistêmicas, como sarcoidose, síndrome de Behçet, artrite reumatoide, doença de Crohn, sífilis, tuberculose e toxoplasmose. A patogênese exata ainda continua indeterminada em várias formas da doença, mas evidências têm demonstrado que a uveíte é uma doença imuno-mediada, influenciada por vários fatores endógenos (Yang *et al.*, 2013).

#### **4.1 Patogênese da uveíte**

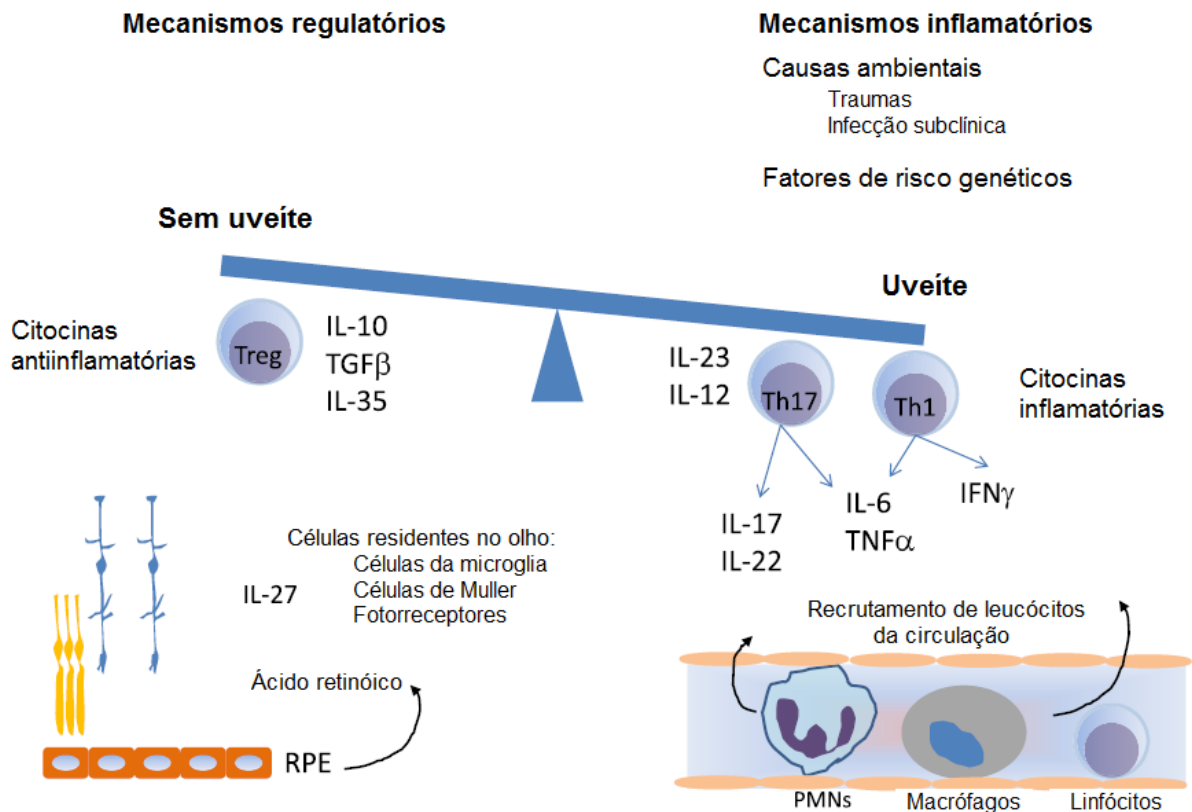
O olho é protegido da invasão de patógenos por dois sistemas, uma barreira anatômica e uma imunológica. A barreira hemato-ocular bloqueia anatomicamente patógenos e células inflamatórias do influxo para o olho a partir da circulação sanguínea periférica, e assim o protege de subsequentes danos teciduais. A uveíte está associada à quebra dessa barreira ocular por mecanismos ainda não

totalmente entendidos (Bousquet *et al.*, 2012), entretanto, supõe-se que a inflamação possa ser a causa dessa ruptura (Klaassen *et al.*, 2013).

Apesar de a uveíte ser uma doença heterogênea com influências poligênicas e ambientais, a maioria das formas de uveíte imunomediadas são causadas por um desequilíbrio entre mecanismos regulatórios que inibem o sistema imune e mecanismos inflamatórios, que combatem organismos infecciosos, mas também podem resultar em doenças crônicas se forem ativados fora de um contexto infeccioso. Esta ativação imune anormal parece resultar de uma combinação de causas ambientais e fatores de risco genéticos que levam a um desequilíbrio da regulação imune e assim, a um quadro inflamatório (Mochizuki *et al.*, 2013).

Um exemplo de componentes do sistema regulatório são os linfócitos T regulatórios, que produzem citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 (Figura 15). Células do EPR, na presença do TGF- $\beta$ , induzem a produção de ácido retinóico por linfócitos T regulatórios, além disso, células residentes da retina, incluindo células ganglionares e fotorreceptores, produzem a IL-27, outra citocina com ação anti-inflamatória. Componentes inflamatórios do sistema imune incluem os linfócitos T-helper Th1 e Th17, que produzem citocinas inflamatórias como a IL-17, IL-23 e IL-2, assim como TNF- $\alpha$ , que recrutam leucócitos da circulação (Lin *et al.*, 2014; Dunn, 2015).

Estudos descritos na literatura avaliaram o perfil de citocinas nos líquidos e tecidos oculares presentes na uveíte. Foram observados que os níveis de citocinas e mediadores inflamatórios como as interleucinas IL-12, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e VEGF estavam elevados. Foi demonstrado que o IL-1 $\beta$  induz uma série de alterações nas barreiras hemato-oculares, que incluem o recrutamento leucocitário, aumento da permeabilidade e alterações morfológicas das células endoteliais (Takase *et al.* 2006; de Smet *et al.* 2011; Klaassen *et al.*, 2013; Dugel *et al.*, 2015).



**Figura 16 - Patogênese da uveíte.** Um desequilíbrio entre os mecanismos regulatórios e inflamatórios contribui para a uveíte. A combinação de causas ambientais e fatores de risco genéticos levam ao aumento de fatores inflamatórios, ocasionando ou levando à cronicidade da uveíte. Treg = células T regulatórias. Adaptado de: (Lin *et al.*, 2014)

## 4.2 Tratamento

O tratamento da uveíte está relacionado à utilização de medicamentos capazes de prevenir ou tratar complicações visuais, aliviar o desconforto dos pacientes e controlar a manifestação inflamatória. Entre as diversas classes de fármacos, encontram-se descritos na literatura a utilização de midriáticos, antiinflamatórios esteroidais, agentes citotóxicos e imunossupressores (Damato *et al.*, 2012; Dunn, 2015; Dolz-Marco *et al.*, 2015).

A uveíte não infecciosa, assim como o edema macular resultante da progressão da doença, é tratada primariamente com corticosteroides pela via sistêmica, mas alcançar níveis terapêuticos intraoculares requer o uso de altas doses levando ao aumento do risco de efeitos adversos, como hipertensão, diabetes mellitus e

osteoporose. Imunossupressores também são utilizados, mas também apresentam sérios efeitos adversos sistêmicos (De Smet *et al.*, 2011).

Como uma alternativa ao tratamento sistêmico, as vias intravítrea e periorcular são utilizadas, mas também estão associadas a efeitos adversos oculares significantes como endoftalmite, hemorragia vítrea e descolamento da retina. A triancinolona acetona é o corticosteroide intravítreo mais comumente utilizado, mas a duração da ação é limitada, além de estar associada a um risco significativo de aumento da pressão intraocular. Entretanto, pesquisas recentes levaram ao desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de diversos corticosteroides, assim como ao uso de metotrexato, agentes inibidores do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e inibidores do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Chen *et al.*, 2015; Sallam *et al.*, 2011).

#### **4.2.1 Injeções intravítreas de corticosteróides**

Os corticosteroides constituem a base do tratamento da uveíte. Um dos mecanismos de ação destes fármacos é a inibição da transcrição de mediadores inflamatórios e a inibição da síntese de prostaglandinas e interleucinas, embora eles também reduzam a expressão do VEGF e estabilizem a barreira hematorretiniana (Herrero-Vanrell *et al.*, 2014; Garweg *et al.*, 2013).

Duas formulações de triancinolona foram aprovadas pelo FDA para uso intravítreo. Diversos estudos demonstram a sua eficácia e melhora da visão após o tratamento. Apesar dos benefícios, as injeções intravítreas de triancinolona apresentam desvantagens relacionadas, principalmente, ao tempo limitado de duração da ação, necessitando assim de múltiplas injeções, e da elevada taxa de efeitos adversos, principalmente a elevação da pressão intraocular (PIO) e a formação de catarata. Pesquisas relatam o desenvolvimento de catarata em 15 a 30 % dos pacientes após a primeira aplicação, e a elevação da PIO em 25 a 45% (Sallam *et al.*, 2011).



### **4.2.2 Imunossupressores**

Com o objetivo de se reduzir a dose de corticosteroides utilizados no tratamento da uveíte, e assim os efeitos adversos relacionados ao seu uso, agentes imunossupressores são empregados na clínica.

Estudos relatam que o uso de ciclosporina levou ao controle da doença de 33% dos casos, em 6 meses de tratamento, e 52% em 1 ano, sendo que 11% dos pacientes tiveram que interromper o uso devido à toxicidade. Resultados semelhantes foram encontrados com a azatioprina e o micofenolato de mofetila, obtendo-se o controle da doença em 62% e 73% dos indivíduos após 1 ano, respectivamente, porém 25% dos pacientes apresentaram efeitos adversos. Assim como os fármacos citados anteriormente, o metotrexato apresentou benefícios similares, entretanto 42% dos pacientes abandonaram o uso pela ineficácia do tratamento e 16% pelos efeitos adversos (de Smet *et al.*, 2011).

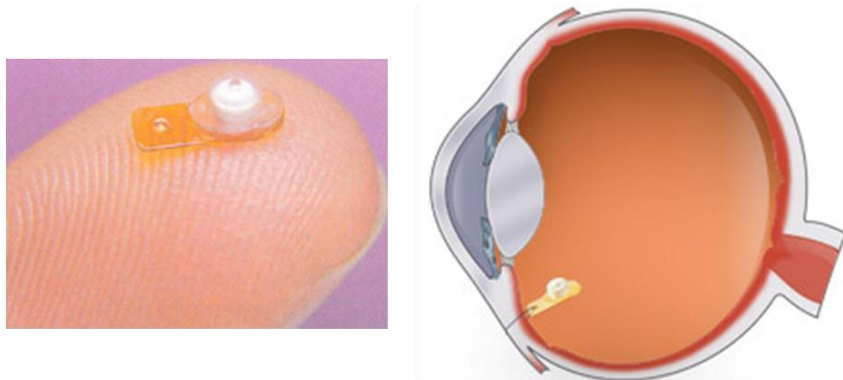
### **4.2.3 Implantes não biodegradáveis**

A fim de aumentar o tempo de duração da ação dos corticosteroides, sistemas de liberação prolongada de fármacos vêm sendo desenvolvidos.

O Retisert® (Bausch & Lomb, Rochester, EUA) é um implante intraocular não biodegradável que contém fluocinolona acetonida (0,59 mg) aprovado pelo FDA para o tratamento de uveíte posterior crônica não infecciosa (Figura 16). É composto por um comprimido de fluocinolona contendo celulose microcristalina, estearato de magnésio e PVA, que promove a liberação do fármaco por aproximadamente 30 meses (Silva *et al.*, 2010).

Diversos estudos demonstraram a eficácia do Retisert em reduzir as recorrências, melhorar a visão e reduzir a necessidade de imunossupressores sistêmicos de pacientes com uveíte severa não-infecciosa (Pavesio *et al.*, 2010), entretanto, quase todos os pacientes desenvolveram catarata e grande parte apresentou aumento da

PIO. Outros efeitos adversos relacionados são o descolamento da retina, endoftalmite, afinamento da esclera, mau funcionamento do implante e o desenvolvimento de infecções oportunistas (Sallam *et al.*, 2011).

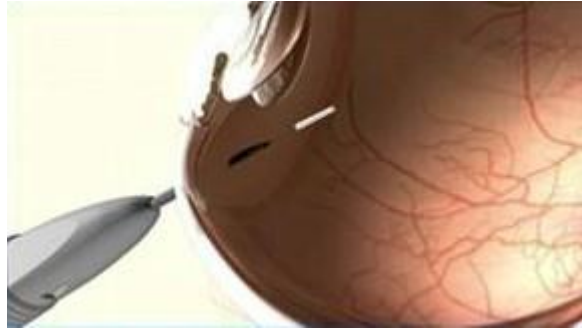


**Figura 17 - Representação esquemática do local de implantação do Retisert. Disponível em: <http://www.retinalphysician.com/>**

Outro fato importante é que o medicamento foi aprovado, inicialmente, com preço extremamente elevado, chegando a custar aproximadamente 14 mil dólares nos EUA.

#### **4.2.4 Implantes biodegradáveis**

O Ozurdex<sup>®</sup> (Allergan Inc., Irvine, EUA) é um implante intravítreo biodegradável de PLGA e dexametasona aprovado pelo FDA em 2009 para o tratamento de uveíte não infecciosa. O sistema cilíndrico contém 0,7 mg de dexametasona e é injetado na cavidade vítrea com o auxílio de um dispositivo especialmente desenvolvido para este fim, sem a necessidade de cirurgia, promovendo a liberação do fármaco por aproximadamente 6 meses (Sallam *et al.*, 2011). Estudos demonstraram a eficácia do implante em controlar a uveíte, com uma baixa incidência de aumento da PIO e do risco do desenvolvimento de catarata (Yasin *et al.*, 2014; de Smet *et al.*, 2011).



**Figura 18** - Representação esquemática da inserção do Ozurdex na cavidade vítrea.

Fialho e colaboradores (2007) desenvolveram implantes biodegradáveis de PLGA e acetato de dexametasona (25%) que promoveram a liberação do fármaco por período superior a 8 semanas *in vivo* (Fialho e Cunha Júnior, 2007). Esse sistema possui uma forma de aplicação totalmente inovadora e já foi avaliado clinicamente em 10 pacientes com oclusão de veia da retina, com resultados promissores (Siqueira *et al.*, 2013).

Implantes biodegradáveis de PLGA e ciclosporina foram desenvolvidos por Saliba e colaboradores (2008) para o tratamento da uveíte. O sistema promoveu a liberação do imunossupressor por aproximadamente 22 semanas (Saliba *et al.*, 2008).

## **JUSTIFICATIVA**

---

A uveíte é um conjunto de doenças inflamatórias oculares graves responsáveis por boa parte dos casos de cegueira irreversível no mundo. Ela acomete principalmente indivíduos na idade socioeconomicamente ativa, sendo o impacto econômico e social causado por elas devido às complicações que encurtam a vida produtiva dos indivíduos, piorando a sua qualidade de vida e onerando os serviços de saúde pública. O uso de sistemas de liberação prolongada de fármacos proporciona inúmeras vantagens, como aumento da biodisponibilidade do fármaco no local de ação, liberação prolongada, redução de efeitos adversos sistêmicos e a frequência de injeções intravítreas, reduzindo as suas complicações e aumentando o conforto e a adesão do paciente ao tratamento. A inserção desses sistemas no espaço supracoroidal, situado entre a esclera e a coróide, promoveria a liberação do fármaco diretamente na coróide e potencialmente na retina, sem a necessidade da inserção na cavidade vítrea, ultrapassando as barreiras propiciadas pela córnea e esclera. O desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de dexametasona, corticosteroide extensamente utilizado no tratamento da uveíte, em matriz de PUD, polímero biodegradável e biocompatível, com propriedades mecânicas ideais para a inserção no espaço supracoroidal, com o intuito de minimizar ou suprimir os efeitos adversos, aumentar o tempo de residência do fármaco no segmento posterior do olho e, conseqüentemente, diminuir a frequência de administração do fármaco parece ser de relevância óbvia, pois pode representar um caminho importante para a terapia de doenças inflamatórias oculares.

Na presente tese são descritas as etapas de desenvolvimento e caracterização dos sistemas bem como estudos de biocompatibilidade e eficácia *in vivo* em modelo de uveíte anterior.

## **OBJETIVOS**

---

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Desenvolver implantes de aplicação supracoroidal constituídos de poliuretanos biodegradáveis e dexametasona visando a liberação prolongada do fármaco e avaliar a biocompatibilidade e eficácia no tratamento de doenças inflamatórias oculares.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver os sistemas de liberação prolongada de poliuretano com diferentes concentrações de dexametasona;
- b) Caracterizar os sistemas desenvolvidos assim como seus produtos de degradação por espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)
- c) Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco.
- d) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos produtos de degradação do implante de PUD contendo dexametasona.
- e) Avaliar a inserção do filme de PUD contendo ou não o fármaco (dexametasona) no espaço supracoroideano em animais saudáveis;
- f) Avaliar a biocompatibilidade, tolerância e toxicidade desses sistemas desenvolvidos;
- g) Indução da uveíte anterior por meio da injeção subcutânea do polissacarídeo (LPS);
- h) Avaliar a eficácia do sistema de liberação desenvolvido no modelo de uveíte experimental através da avaliação da resposta inflamatória por meio de avaliação clínica dos animais, e das técnicas de histologia, imunohistoquímica e PCR.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

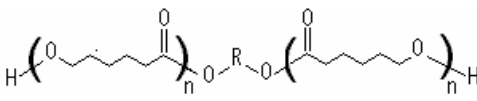
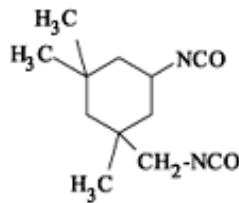
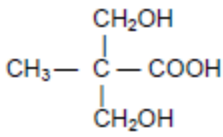
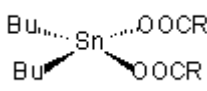
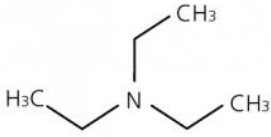
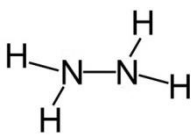
---



## 6 MATERIAIS

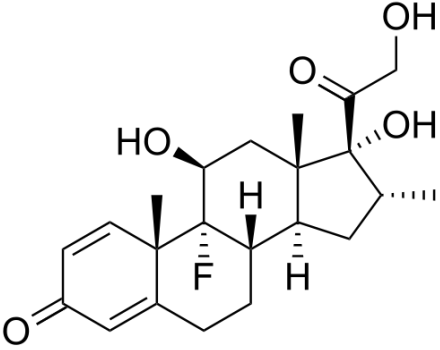
A tabela 2 relaciona os materiais utilizados na síntese da dispersão aquosa de poliuretano:

**Tabela 2 – Estruturas químicas dos materiais utilizados na síntese da dispersão aquosa de poliuretano.**

<b>Diol</b>	PCL 1000 PCL 2000 PEG 1500	
<b>Diisocianato</b>	Isoforona diisocianato (IPDI)	
<b>Emulsificante interno</b>	Ácido dimetilol propiônico (DMPA)	
<b>Catalisador</b>	Dibutil dilaurato de estanho	
<b>Neutralizante</b>	Trietilamina (TEA)	
<b>Extensor de cadeia</b>	Hidrazina (HZ)	

Na tabela 3 estão descritas as características da dexametasona utilizada nos implantes de poliuretano.

**Tabela 3 – Características da dexametasona utilizada no preparo dos implantes de poliuretano.**

<b>Estrutura</b>	
<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> FO <sub>5</sub>
<b>Massa Molar</b>	392,46 g/mol

## 7 MÉTODOS

### 7.1 Síntese da dispersão aquosa de poliuretano

A dispersão aquosa de poliuretano foi preparada pelo método convencional no qual se produz um pré-polímero (por meio da reação entre diol e diisocianato) em cuja cadeia são inseridos grupos hidrofílicos a partir do DMPA que, após neutralizados com TEA passam a agir como emulsificantes internos e possibilitam a dispersão do poliuretano em água. A reação de extensão de cadeia com diamina (hidrazina) é feita imediatamente após a etapa de dispersão, a fim de evitar a reação entre grupos NCO e água. Nessa etapa são produzidas ligações uréia que fazem parte dos segmentos rígidos do poliuretano (Ayres, 2006). Abaixo encontra-se um esquema com as reações da síntese e dispersão do PU em água (Figura 19).

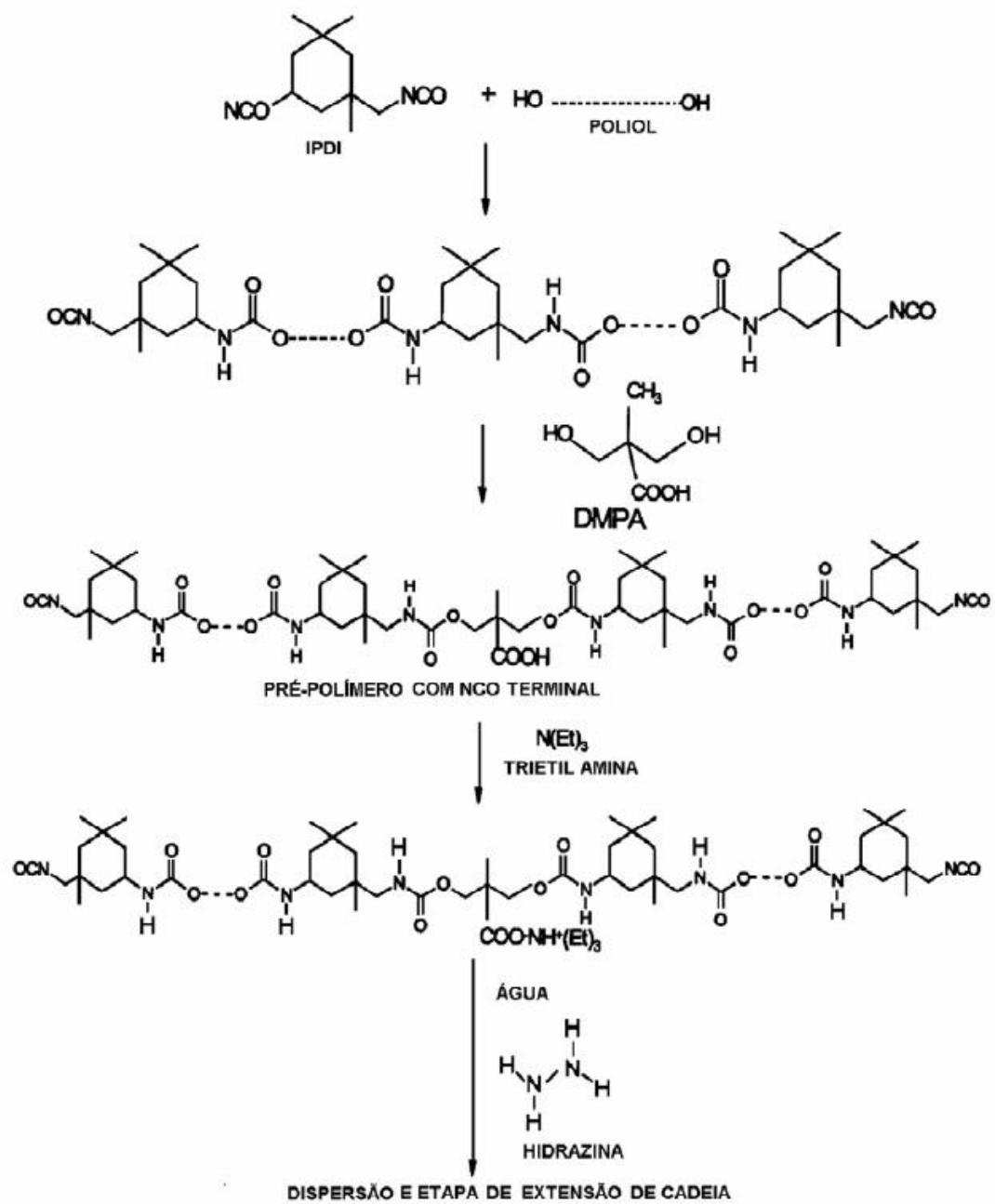


Figura 19 - Esquema de reações da síntese e dispersão aquosa do poliuretano em água.

Fonte: AYRES, 2006.

### Preparação do pré-polímero

A síntese foi feita em um balão de 3 vias sob agitação, aquecimento e atmosfera inerte de N<sup>2</sup>. Transferiram-se quantidades exatas dos polióis PCL 1000, PCL 2000, PEG 1500, assim como DMPA para o reator. Esses reagentes foram mantidos sob agitação, a uma temperatura de 60°C por cerca de 30 minutos para que os componentes se dissolvessem no meio. Ao reator foi adicionada quantidade exata de IPDI para obtenção de uma razão NCO/OH de 2,29 e a temperatura da mistura reacional foi mantida em 70-75°C por 2 horas. Em seguida, adicionou-se o catalisador dibutil dilaurato de estanho (DBDLT) em quantidade correspondente a 0,01% em massa sobre a quantidade total de reagentes, sendo a temperatura mantida a 70-75°C por mais 1 hora, quando foi feita uma nova adição de catalisador idêntica à primeira. A mistura foi novamente mantida à temperatura de 70-75°C por 1 hora. Após isso, a mistura reacional foi resfriada à temperatura de 50-60°C e retirou-se uma amostra do pré-polímero para determinação titulométrica da porcentagem de NCO livre. O resultado deve ser o mais próximo possível da porcentagem teórica, calculada conforme a equação 1:

$$\% NCO_T = \frac{(n_{NCO} - n_{OH}) \times 42100}{m_{pp}} \quad (1)$$

Onde:

$\% NCO_T$  = porcentagem teórica de grupos NCO livres.

$n_{NCO}$  = número de equivalentes-gramas do diisocianato usado.

$n_{OH}$  = somatório do número de equivalentes-gramas de todos os reagentes hidroxilados usados.

$m_{pp}$  = massa total do pré-polímero.

Para realizar a titulação, foram colocados 50 mL da solução de di-n-butilamina e 10 g do pré-polímero em um erlenmeyer de 500 mL. A mistura foi agitada e aquecida até início da ebulição. Após resfriamento, foram adicionados 100 mL de metanol e 2 gotas de azul de bromofenol. O mesmo procedimento foi repetido para o ensaio em branco. A titulação foi realizada com ácido clorídrico 1 mol/L. O ponto de viragem foi evidenciado pela mudança de coloração de azul para verde e depois para amarelo leitoso e a porcentagem de NCO livre foi calculada pela equação 2:

$$\% NCO = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times f \times 4,202}{\rho_{amostra}} \quad (2)$$

Onde:

$V_{amostra}$  = volume em mL de HCl 1 mol/L consumido na titulação.

$V_{branco}$  = volume em mL de HCl 1 mol/L consumido na titulação de di-n-butilamina pura (sem amostra).

$f$  = fator de correção da concentração de HCl 1 mol/L especificado no frasco do reagente.

$\rho_{amostra}$  = peso da amostra.

Para o preparo da solução de di-n-butilamina pesou-se 206,8 g desta, diluiu-se em tolueno e completou-se o volume da solução para 2 litros.

Adicionou-se TEA ao pré-polímero com grupos NCO terminais com o objetivo de neutralizar os grupos carboxílicos do DMPA, mantendo-se a temperatura a 40°C por 40 minutos sob agitação vigorosa. Para tal, calculou-se a quantidade de TEA pela equação 3:

$$m = n \times 101 \quad (3)$$

Onde:

$m$  = massa de TEA

$n$  = número de equivalentes-grama de grupamentos carboxílicos obtidos dividindo-se a massa de DMPA usada no pré-polímero por 134, que é o equivalente grama do DMPA, em relação ao grupamento carboxílico

101 = equivalente-grama da TEA

#### *Reação de extensão da cadeia*

Em seguida dispersou-se o pré-polímero neutralizado em água e, imediatamente após, foi realizada a reação de extensão de cadeia com a adição de hidrazina (HZ), mantendo-se a temperatura da dispersão aquosa em 40°C por 1 hora. A quantidade do extensor de cadeia é calculada de acordo com a porcentagem de grupos NCO livres encontrada por meio da titulação com di-n-butilamina, usando-se a equação 4:

$$m = \frac{\left(\frac{m_{pp}}{100 \times NCO_p}\right) \times \left(\frac{16}{0,64}\right)}{42} \quad (4)$$

Onde:

$m$  = massa de hidrazina (equivalente = 16 g/mol e concentração de 64%)

$m_{pp}$  = massa do pré-polímero

$NCO_p$  = % NCO obtido na titulação

42 é o equivalente-grama do grupamento NCO.

## 7.2 Preparo dos filmes de poliuretano e dexametasona

Os filmes foram preparados pela incorporação de dexametasona (DX) à dispersão aquosa de poliuretano (PUD). Para tal, foram adicionados 6,0 mg, 18,8 mg ou 29,0 mg de DX à 2,0 g de PUD, sob agitação por 30 minutos, visando obter uma concentração final de 8, 20 e 30% p/p do fármaco, respectivamente. As misturas foram transferidas para moldes de Teflon® e deixadas à temperatura ambiente por 2 dias. Após isso, os filmes foram cortados no formato de retângulos de aproximadamente 1 x 3 mm. Também foram preparados filmes brancos (sem o fármaco) pelo mesmo método.

## 7.3 Estudo de degradação *in vitro* do poliuretano

A degradação *in vitro* dos filmes de PUD branco e PUD-DX (30%) foi realizada em incubadora, a 30 rpm e 37 °C. Os filmes (n = 6 para cada poliuretano), cortados em forma de quadrados de 6 x 6 mm de comprimento, foram colocados em frascos de vidro contendo 1 mL de PBS pH 7,4. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, os filmes foram removidos do PBS, e os produtos de degradação, assim como os próprios filmes foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho.

## 7.4 Caracterização dos implantes de PUD e DX

### *Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

A espectroscopia no infravermelho (IV) é uma técnica empregada para a identificação de grupos funcionais de moléculas expostas a uma radiação no infravermelho. A interpretação dos espectros obtidos está relacionada com a identificação das bandas características de cada grupo químico.



As análises de FTIR foram realizadas no espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. Obtiveram-se os espectros dos filmes usando-se a técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR). As amostras de DX, e dos filmes de PUD contendo 8, 20 e 30% de DX foram pressionadas contra um cristal de seleneto de zinco, e os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , no intervalo de  $4000$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ .

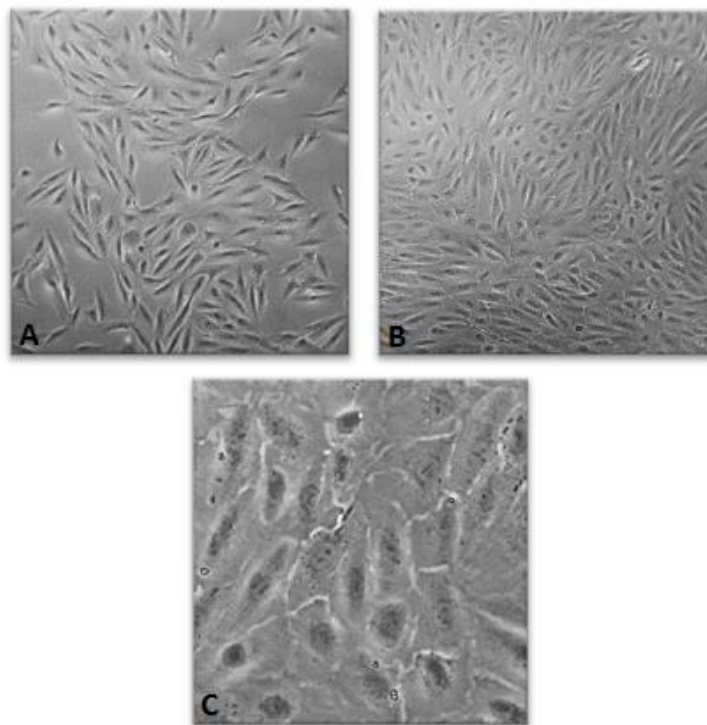
### **7.5 Estudo de liberação *in vitro***

O estudo de liberação *in vitro* da DX a partir dos implantes foi realizado em recipientes plásticos contendo 2mL de PBS pH 7,4, obedecendo as condições *sink*. Esse estudo foi realizado em incubadora com temperatura mantida constante em  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ), visando aproximar o experimento das condições encontradas *in vivo*.

Foram utilizados implantes de PUD brancos e PUD contendo 8, 20 e 30% de DX, totalizando 24 implantes ( $n=6$  para cada grupo analisado). Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, o meio de incubação dos implantes foi totalmente retirado para posterior quantificação e a solução tampão dos frascos foi renovada. O fármaco liberado no meio de incubação foi quantificado por CLAE, de acordo com o método analítico descrito na farmacopeia americana (EUA, 2006). Foi utilizado o cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters® (bomba Waters® 515 e auto-injetor Waters® 717 plus) acoplado a detector Waters® 2487. A coluna utilizada foi a Chromolith® RP-18E, de 4,6 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento, com tamanho de partícula de  $2\text{ }\mu\text{m}$  (Merk KGaA Performance & Life Science Chemicals, Alemanha). A fase móvel utilizada foi composta de uma mistura de água e acetonitrila (45:55), em um fluxo igual a  $1,0\text{ mL/min}$  e comprimento de onda de detecção no ultravioleta em  $254\text{ nm}$  (Fialho *et al.*, 2008).

## 7.6 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos produtos de degradação dos implantes de PUD contendo dexametasona

Para avaliar a citotoxicidade dos produtos de degradação dos implantes de PUD-DX (30%), foi utilizada a linhagem celular ARPE-19 (Figura 20). Essa linhagem celular surgiu espontaneamente a partir da cultura primária de células do EPR humano e possui um alto potencial de crescimento (Dunn *et al.*, 1996). O epitélio pigmentado da retina (EPR) desempenha um papel crítico no desenvolvimento e manutenção dos fotorreceptores adjacentes à retina dos vertebrados, além de contribuir com altos níveis de VEGF para os tecidos do segmento posterior do olho (Ayalasomayajula *et al.*, 2009).



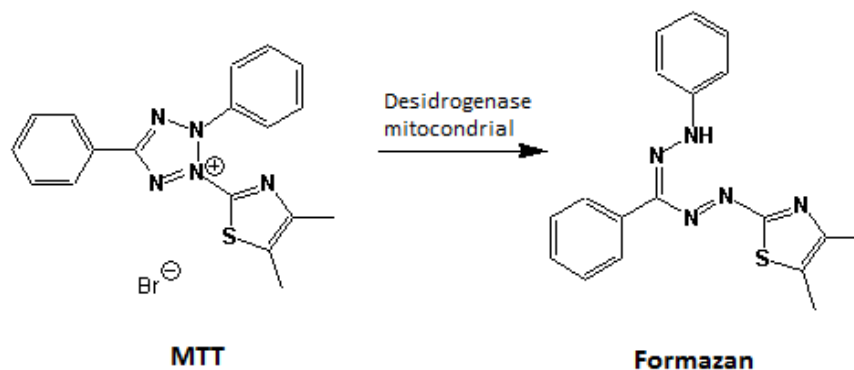
**Figura 20 - ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C).**

A ARPE-19 (Invitrogen, Cergy Pontoise, França) foi cultivada em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e tampão hepes (afim de ajustar o pH para 7,2), sendo incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Os implantes de PUD-DX (30%) foram esterilizados em luz ultravioleta por 45 minutos cada lado no início do experimento. A seguir, os implantes (6 x 6 mm de comprimento) foram incubados em 3 mL de PBS a 37°C por 4 meses, quando o PBS contendo os produtos de degradação foi coletado.

As células foram semeadas em placas de poliestireno de 24 poços na densidade de  $4 \times 10^5$  células/poço. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e cada poço foi lavado com PBS, quando se iniciou a aplicação da mistura do meio de cultura com o PBS contendo os produtos de degradação na proporção de 10:1. As células controle foram incubadas apenas com meio de cultura. Após 1 e 4 dias, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico MTT.

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmichael e colaboradores (1987), consiste na redução do MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil) pela enzima desidrogenase mitocondrial presente somente nas células viáveis, gerando formazan, composto azul-violeta, que uma vez precipitado e solubilizado em DMSO é quantificado por espectrofotometria a 550 nm (Carmichael *et al.*, 1987). As estruturas dos compostos acima estão elucidadas na Figura 21.



**Figura 21** - Transformação do MTT em formazan pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células vivas. Disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/MTT\\_assay](http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay).

Os experimentos foram realizados em quadruplicata, sendo o resultado expresso como a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (tratado com meio de cultura).

## 7.7 Animais

Foram utilizados fêmeas de ratos da raça Lewis, com idade média de 8 semanas e pesando aproximadamente 250 g (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, França). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura e umidade controladas. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin» (ID Ce5/2012/122), INSERM U289, Hôpital Salpêtrière, Paris) e realizados de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para uso de animais em pesquisa em oftalmologia.

## 7.8 Inserção dos sistemas no espaço supracoroidal

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com procedimento descrito na literatura (Einmahl *et al.*, 2002), com o auxílio de microscópio cirúrgico (OM-5, TAKAGI, Nagano, Japão). Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de quetamina/xilasina (87 mg/mL e 13 mg/mL), 1mL/Kg, após isso, foi administrada tetracaína 1% e tropicamida 2% topicamente. Uma incisão de aproximadamente 2 mm foi realizada na conjuntiva e esclera com uma agulha de 25 G à 5 mm do limbo, na região da pars plana. A mesma agulha foi utilizada a fim de se revelar o espaço supracoroidal, entre a esclera e coróide. Os filmes de PUD e PUD-DX (30%) foram inseridos sem necessidade de sutura da esclera e conjuntiva (Fig 28C). Não foi observado refluxo de material pela esclerotomia. Imediatamente após a cirurgia, o fundo do olho foi examinado com o auxílio de uma lâmpada de fenda e por tomografia de coerência óptica (OCT) para verificar a existência de danos na retina ou sinais de hemorragia.

## **7.9 Estudo da biocompatibilidade *in vivo* dos filmes de PUD e PUD-DX**

A fim de se avaliar a biocompatibilidade dos filmes de PUD e PUD-DX (30%), assim como a viabilidade e segurança da inserção destes no espaço supracoroidal, foi realizado um experimento no qual os implantes foram inseridos neste espaço, utilizando a técnica descrita abaixo. Utilizaram-se 12 animais divididos em 2 grupos experimentais (n=6), sendo que em um grupo foi implantado o filme de PUD branco e em outro grupo, filme de PUD-DX 30%, sendo os filmes cortados em retângulos de 3 mm x 1 mm. Imediatamente após a cirurgia, foi realizada uma tomografia de coerência óptica (OCT), avaliando-se o posicionamento do implante no espaço supracoroidal, a integridade dos tecidos adjacentes e a existência ou não de hemorragia e descolamento da retina. Os animais foram avaliados diariamente e, ao final de 15 dias, foram sacrificados com dose letal de pentobarbital (100 mg/kg) para a retirada das amostras para estudos posteriores (avaliação histopatológica).

### **7.9.1 Avaliação histopatológica**

Após o sacrifício dos animais, os bulbos oculares foram imediatamente enucleados e fixados com solução de para-formaldeído 4% e glutaraldeído 0,5% em PBS por 2 horas. Os bulbos oculares fixados foram lavados com PBS por 2 horas, e desidratados com etanol 70% e 95% por 2 horas cada concentração. Em seguida, os bulbos foram incubados em uma mistura de etanol 95% e meio de infiltração historesina (1:1) por 2 horas. Finalmente, incubaram-se os bulbos em meio de infiltração historesina por 12 horas à temperatura de 4 °C. Ao término do tempo previsto, os bulbos foram inseridos no meio de inclusão historesina, em suporte plástico específico. Aguardou-se a polimerização do meio de inclusão historesina, e então, colocou-se a tampa sobre o molde plástico. Esta tampa apresentava um orifício central que possibilitou a introdução de pequena quantidade de meio de inclusão historesina. Aguardou-se novamente a polimerização do meio de inclusão recém acrescentado. Transferiu-se o molde plástico com tampa para banho de gelo, por 30 minutos, e em seguida, transferiu-se para estufa a 37 °C por 24 horas.

Preparou-se o meio de infiltração historesina conforme instrução do fabricante (Leica): acrescentou-se 0,5 g de peróxido de dibenzoíla (Activator) em 50 mL de 2-(hidroxietil)- metacrilato (Basic Resin), sob agitação. O meio de infiltração historesina foi conservado a 4 °C e ao abrigo da luz.

Os blocos foram cortados com o auxílio do micrótomo RM2055 Leica® em seções de 5 µm de espessura, e as lâminas foram coradas com azul de toluidina a 1% para análise por microscopia de luz (microscópio Olympus IX70 acoplado à câmara digital), afim de se avaliar a integridade dos tecidos oculares, a presença ou não de células inflamatórias e hemorragia, e o correto posicionamento dos filmes no espaço supracoroidal.

#### **7.10 Estudo da atividade anti-inflamatória dos filmes de PUD DX em modelo animal de uveíte - Modelo EIU (*endotoxin-induced uveitis*)**

Com o objetivo de se avaliar a eficácia dos filmes de PUD DX, foi utilizado um modelo animal de uveíte. O modelo de uveíte induzida por endotoxina (do inglês *endotoxin-induced uveitis* – EIU) é um modelo de uveíte humana aguda em ratos, onde células residentes (células microgliais e células endoteliais e epiteliais da íris e corpo ciliar) são inicialmente ativadas e produzem citocinas, quimiocinas e iNOS aproximadamente 4 horas após a injeção de LPS. Após 8 horas, macrófagos e neutrófilos sob a influência de citocinas secretam prostaglandina 2 e óxido nítrico (NO) levando à quebra da barreira hemato-ocular, resultando na migração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos para os tecidos do segmento anterior do olho (Bousquet *et al.*, 2012).

Inicialmente, os implantes foram inseridos no espaço supracoroidal de acordo com o protocolo descrito acima. Utilizaram-se 18 animais divididos em 3 grupos experimentais (n=6), sendo que no primeiro grupo foi implantado o filme de PUD branco, no segundo grupo filme de PUD-DX 30% e no terceiro grupo não foi inserido nenhum filme, sendo este o grupo controle do experimento. Imediatamente após a cirurgia, foi realizada uma tomografia de coerência óptica (OCT), avaliando-

se o posicionamento do implante no espaço supracoroidal, a integridade dos tecidos adjacentes e a existência ou não de hemorragia e descolamento da retina.

A uveíte foi induzida em todos os animais 15 dias após a implantação dos filmes pela injeção subcutânea de 100  $\mu$ L de solução salina contendo 200  $\mu$ g de lipopolisacarídeo (LPS) de *Salmonella typhimurium* (Sigma-Aldrich) na pata dos animais de acordo com protocolo descrito na literatura (Figura 22) (Touchard *et al.*, 2010). A inflamação aguda do segmento anterior do olho atinge sua intensidade máxima em 24 horas após a indução, e então se resolve espontaneamente em 7 dias (Bousquet *et al.*, 2012).



**Figura 22** - Injeção subcutânea de 100  $\mu$ L de solução salina contendo 200  $\mu$ g de LPS na pata traseira para a indução da uveíte induzida por endotoxina (EIU).

### 7.11 Avaliação da resposta inflamatória

Para a avaliação da resposta inflamatória e da eficácia dos implantes de PUD DX, após 24 horas da indução da EIU os animais foram avaliados clinicamente e

sacrificados com dose letal de pentobarbital (100 mg/kg) para a retirada das amostras para estudos posteriores (histopatologia, imunohistoquímica e PCR).

### **7.11.1 Avaliação clínica**

O estado clínico de todos os animais foi avaliado com o auxílio de uma lâmpada de fenda pela oftalmologista Dra. Francine Behar-Cohen, sendo a inflamação classificada de 0 a 5 de acordo com os seguintes critérios (SUN Group, 2005):

**Tabela 4 - Graduação da inflamação ocular de acordo com avaliação clínica.**

<b>Graduação</b>	<b>Sinais</b>
0	Ausência de inflamação
1	Vasodilatação mínima da íris e conjuntiva, sem células na câmara anterior
2	Vasodilatação moderada da íris e conjuntiva, sem células na câmara anterior
3	Vasodilatação intensa da íris e conjuntiva, menos de 10 células por campo na câmara anterior
4	Sinais clínicos mais severos que na graduação 3, mais de 10 células na câmara anterior com ou sem a formação de hipópio (acumulação de células inflamatórias na câmara anterior)
5	Reação inflamatória intensa, formação de fibrina na câmara anterior do olho, total seclusão pupilar (não reatividade da pupila à luz devido à formação de coágulos de fibrina)

Fonte: Bousquet *et al.*, 2012.

### **7.11.2 Avaliação histopatológica**

Após o sacrifício dos animais, os olhos foram imediatamente enucleados e tratados de acordo com o protocolo descrito anteriormente. 4 olhos de diferentes animais de



cada grupo experimental foram utilizados nessa análise a fim de se avaliar a integridade dos tecidos oculares, quantificar as células inflamatórias resultantes da indução da uveíte anterior e avaliar a presença de hemorragia.

### **7.11.3 Contagem das células inflamatórias**

A fim de se quantificar o efeito da DX liberada do filme de PUD na inflamação ocular, o número de células inflamatórias presentes no segmento anterior do bulbo ocular foi quantificado nos cortes seriados de historesina ao nível do nervo óptico, após a coloração das lâminas com azul de toluidina (mínimo 5 seções por olho). O número de células foi expresso em função da média  $\pm$  desvio padrão.

### **7.11.4 Imunofluorescência**

Olhos coletados após o experimento da EIU (3 olhos por grupo experimental) foram congelados no composto Tissue-Tek OCT (Bayer Diagnostics, Puteaux, França) e posteriormente os blocos obtidos foram cortados em criostato, obtendo-se seções de 10  $\mu$ m de espessura para as análises imunohistoquímicas.

Primeiramente, as lâminas foram fixadas com solução de para-formaldeído 4% por 15 minutos e em seguida passaram por 3 lavagens com PBS. Após isso realizou-se a permeabilização dos cortes com triton (0,1%) por 30 minutos, passando também por 3 lavagens com PBS. As lâminas foram incubadas em câmara úmida com soro de cabra (5%) por 1 hora e lavadas com solução de triton 0,1%. Em seguida, procedeu-se a incubação com os anticorpos primários por 1 hora, seguida de lavagens com triton e após, a incubação com os anticorpos secundários por 1 hora ao abrigo da luz. Então, as lâminas foram tratadas com DAPI (1:5000, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, França) para evidenciar os núcleos celulares. O controle negativo foi realizado sem a adição de anticorpo primário.

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: mouse monoclonal anti-CD68 (ED1) (diluição 1:50, Serotec, Oxford, Inglaterra) para monócitos, macrófagos e células dendríticas; rabbit polyclonal anti-IBA-1 (diluição 1:400, Wako, Richmond, EUA), um marcador específico de microglia/macrófagos; mouse monoclonal anti-iNOS (diluição 1:75, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA).

Os anticorpos secundários utilizados foram: goat anti-mouse Alexa 488 (1:250, verde, Wako, Richmond, EUA); mouse anti-rabbit Alexa 564 (1:250, rosa, Invitrogen).

As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência (Olympus BX51, Rungis, France), equipado com câmera digital (Olympus DP70).

#### **7.11.5 Contagem das células ED1 positivas**

Com o objetivo de se confirmar o efeito da DX liberada do filme de PUD na inflamação ocular, células polimorfonucleares e inflamatórias ED1 positivas, identificadas pelo formato do núcleo marcado com DAPI, foram quantificadas nos cortes das lâminas processadas. As análises foram realizadas em todo o olho ao nível do nervo óptico (3 olhos de diferentes animais por grupo, 4 seções por olho) (Touchard *et al.*, 2010). O número de células foi expresso em função da média  $\pm$  desvio padrão.

#### **7.11.6 PCR em tempo real**

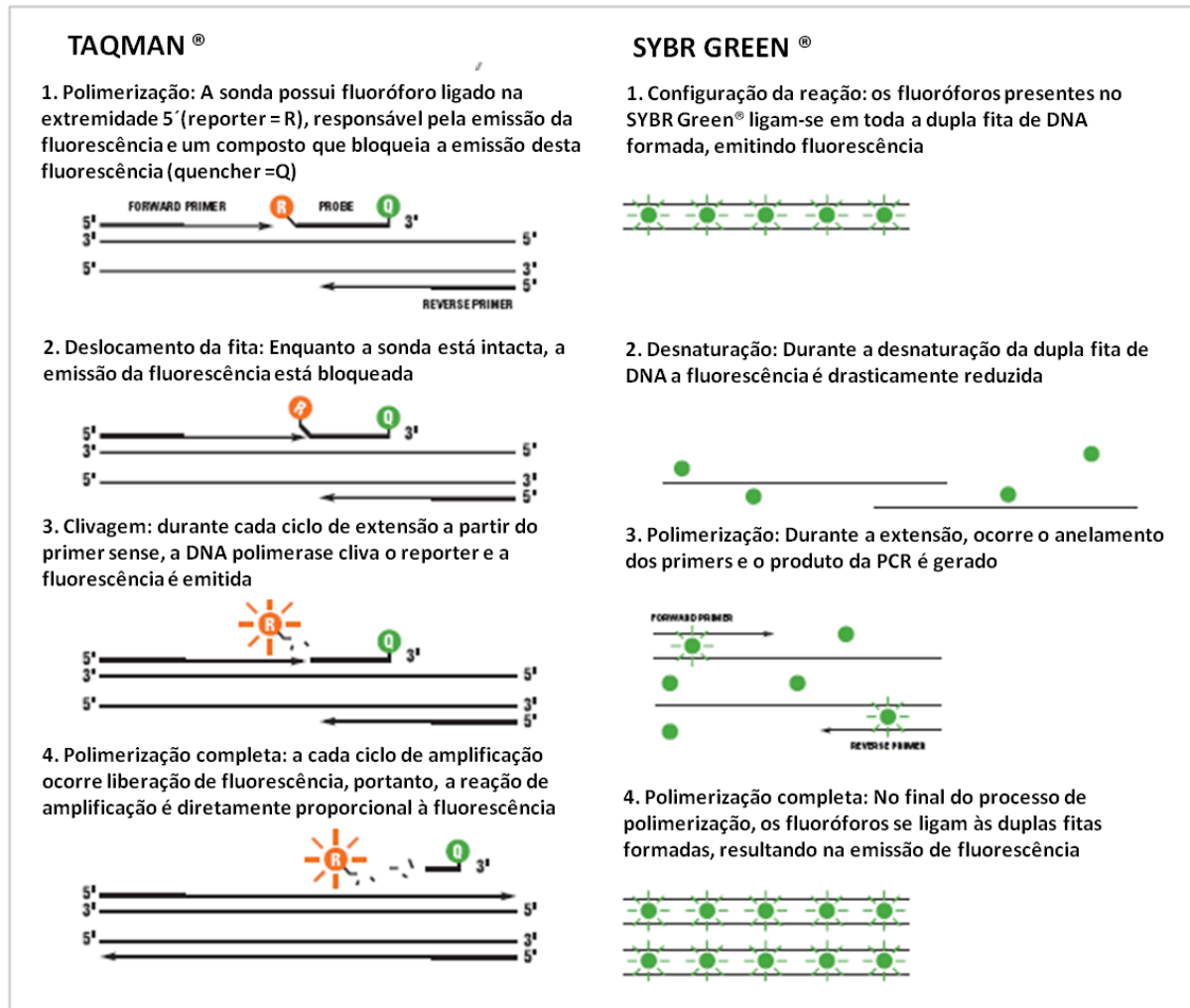
Imediatamente após a enucleação, os olhos dos animais (5 olhos por grupo) foram dissecados sendo a íris/corpo ciliar e retina retirados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para o uso posterior.

O RNA total foi extraído dos tecidos utilizando o kit RNeasy Mini-Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Courtaboeuf, França) de acordo com as instruções do fabricante, e o cDNA foi sintetizado utilizando random primers (Invitrogen, Cergy Pontoise, França) e

transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen). O PCR em tempo real (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, EUA) foi realizado com detecção de corante de ligação ao DNA fluorescente (SYBR Green, Invitrogen) e TaqMan (Applied Biosystems). Foi avaliada a expressão dos genes IL1 $\beta$ , IL-6, IL-23, IL-10, CINC, NOS2, VEGF e ocludina, sendo HPRT utilizado como controle interno. Na Tabela 5 estão descritas as sequências dos primers utilizados e na figura 23 está representado um esquema da reação de PCR em tempo real.

**Tabela 5 – Primers utilizados no PCR em tempo real.**

<b>Gene</b>		<b>Primers TaqMan</b>
HPRT1		Rn01527840_m1
TNF- $\alpha$		Rn01525859-g1
IL-1 $\beta$		Rn00676333_g1
IL-6		Rn01410330_m1
iNOS		Rn00561646-m1
<b>Gene</b>		<b>Primers SYBR Green</b>
HPRT1	Sense	5'-GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT-3'
	Antisense	5'-GCCACATCAACAGGACTCTTGTAG-3'
IL-10	Sense	5'-CCTCTGGATACAGCTGCGAC-3'
	Antisense	5'-GTAGATGCCGGGTGGTTCAA-3'
CINC	Sense	5'-GGGTGTCCCAAGTAATGGA-3'
	Antisense	5'-CAGAAGCCAGCGTTCACCA-3'
IL-23	Sense	5'-GCGTTCTCTTCTCCGTTCCA-3'
	Antisense	5'-TGCTCCGTGGGCAAAGAC-3'
VEGF	Sense	5'- GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTC -3'
	Antisense	5'- CGATCG TTCTGTATCAGTCTTTCC -3'
OCLUDINA	Sense	5'-TCCAGAGTCTTCCTATAAATCCAC-3'
	Antisense	5'-ACCACCGCTGCTGTAACGT-3'



**Figura 23 – Compara o dos sistemas utilizados para a realiza o da PCR em tempo real.**  
 Fonte: Adaptado de [www.biosyn.com](http://www.biosyn.com).

## 7.12 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em fun o da média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA one-way) seguida pelo pós-teste de Bonferroni.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **8 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Doenças que afetam o segmento posterior do olho são uma das principais causas de cegueira nos países desenvolvidos. Estas doenças incluem uveíte, a retinopatia diabética, o edema macular, a degeneração macular relacionada à idade, entre outras. O tratamento dessas doenças envolve a administração de injeções intravítreas, que proporcionam uma concentração elevada do fármaco na retina. No entanto, para manter a concentração terapêutica no local de ação, são necessárias repetidas injeções, que são associadas a um elevado risco de hemorragia vítrea, descolamento de retina, elevação da pressão intraocular, catarata e endoftalmite.

Uma das estratégias para melhorar a biodisponibilidade de fármacos e minimizar os riscos das injeções intravítreas no segmento posterior do olho envolve o desenvolvimento de implantes intraoculares. Estes sistemas são inseridos na câmara posterior, superando as barreiras naturais oculares, e são capazes de fornecer níveis terapêuticos de fármacos diretamente no interior do olho por um longo período. Além disso, os implantes intraoculares desenvolvidos com matriz polimérica biodegradável oferecem a vantagem de não exigir a remoção cirúrgica após a completa liberação dos fármacos.

Neste estudo, implantes intraoculares compostos de dexametasona incorporada em poliuretano biodegradável foram desenvolvidos e seu potencial para a liberação prolongada do fármaco no espaço supracoroidal, visando a inibição/minimização de processos inflamatórios e angiogênicos estabelecidos em doenças vítreoretinianas foi avaliado.

### **8.1 Síntese da dispersão aquosa de poliuretano (PUD)**

Para o desenvolvimento dos implantes, um poliuretano biodegradável foi sintetizado usando a policaprolactona (PCL) e o polietilenoglicol (PEG) como segmento flexível, e o grupo uretano como segmento rígido. O segmento rígido proporcionou estabilidade dimensional, atuando como ligações cruzadas termicamente

reversíveis, já o segmento flexível forneceu o caráter elástico à cadeia polimérica. Sendo assim, é possível obter um filme polimérico resistente, com boas propriedades mecânicas e ao mesmo tempo flexível.

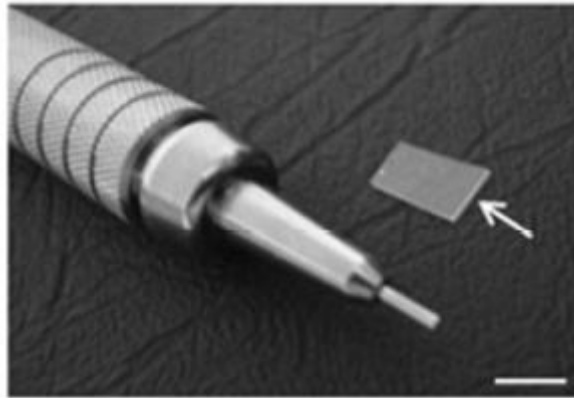
As reações de síntese do pré-polímero e da extensão da cadeia possibilitaram a obtenção de uma dispersão aquosa de poliuretano com aproximadamente 25% de conteúdo de sólidos. A tabela 6 apresenta a composição do PUD sintetizado para o preparo dos filmes poliméricos.

**Tabela 6 - Composição da dispersão aquosa de poliuretano.**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração (% p/p)</b>
Isoforona diisocianato (IPDI)	8,58
Policaprolactona (PCL 1000)	4,85
Policaprolactona (PCL 2000)	8,36
Polietilenoglicol (PEG 1500)	0,73
Ácido dimetilol propiônico (DMPA)	0,97
Trietilamina (TEA)	0,73
Água	74,70
Hidrazina (HZ)	1,08

## **8.2 Preparação dos filmes de poliuretano e dexametasona**

Os filmes desenvolvidos apresentaram-se como um sistema homogêneo, com espessura igual a 0,3 mm, adequada para a posterior inserção no espaço supracoroidal (Figura 24).



**Figura 24** - Filmes de poliuretano contendo dexametasona (30%). Barra = 5 mm.

### **8.3 Caracterização dos implantes de PUD sem fármaco e PUD-DX**

A fim de se confirmar ou descartar uma possível interação entre o fármaco e o polímero, foram realizadas análises no infravermelho, já que cada material possui distintos grupos químicos que apresentam bandas específicas nos espectros obtidos. As Tabelas 7 e 8 apresentam as principais bandas de absorção na região do infravermelho características do PU e da DX, respectivamente.

Os poliuretanos são capazes de formar interações de hidrogênio nas quais o doador de prótons é grupo N-H da ligação uretano, ao passo que os grupos receptores podem incluir tanto a carbonila adjacente à própria ligação uretano como a carbonila da ligação éster, quando o segmento macio for um poliéster, ou o átomo de oxigênio da ligação éter, quando o segmento macio for um poliéter. A presença das interações de hidrogênio se manifesta pelo deslocamento das bandas de absorção do estiramento dos grupos N-H e C=O para frequências mais baixas que aquelas observadas quando estes grupos não estão associados por meio de interações de hidrogênio (Ayres, 2006).

**Tabela 7 – Principais bandas de absorção na região do infravermelho características de poliuretanos.**

<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>
<b>3446</b>	Estiramento N-H (livre)
<b>3330</b>	Vibração de estiramento N-H (ligado) e O-H
<b>3000 – 2840</b>	Estiramento C-H
<b>2270</b>	Estiramento N=C=O
<b>1729</b>	Estiramento C=O (éster e uretano livre)
<b>1707</b>	Estiramento C=O (éster e uretano ligado)
<b>1700 – 1690</b>	Estiramento C=O (ureia livre)
<b>1640</b>	Estiramento N-H (amida secundária)
<b>1610 – 1550</b>	Estiramento simétrico COO <sup>-</sup>
<b>1520</b>	Estiramento C-N + deformação N-H
<b>1470 – 1430</b>	Deformação assimétrica CH <sub>3</sub>
<b>1475 – 1450</b>	Deformação CH <sub>2</sub>
<b>1192 – 1150</b>	Estiramento de éter

**Tabela 8 – Principais bandas de absorção na região do infravermelho características da dexametasona.**

<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>
<b>3600 – 3140</b>	Estiramento O-H (álcool)
<b>3122 – 2750</b>	Estiramento C-H
<b>1730 – 1650</b>	Estiramento C=O (éster e cetona)
<b>1615 – 1600</b>	Estiramento C=C
<b>880</b>	Estiramento C-F

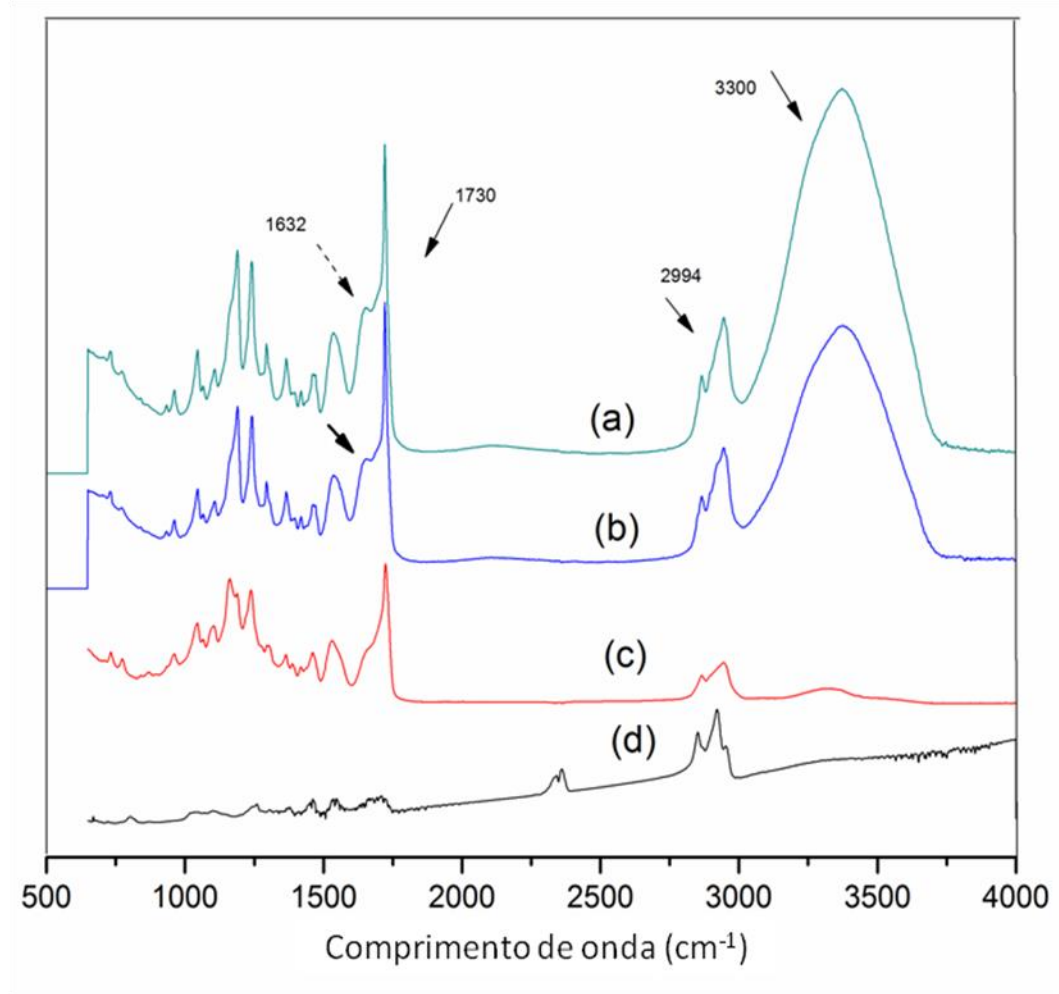
A Figura 25d apresenta o espectro de infravermelho dos implantes de PUD branco. As amostras de PUD apresentaram bandas de absorção no infravermelho típicas, como estiramento de grupos carbonila presentes no uretano, ureia e éster (~1730 cm<sup>-1</sup>); deformação de grupos CH<sub>3</sub> (~1450 cm<sup>-1</sup>); estiramento dos grupos CH<sub>2</sub>



assimétrico e simétrico ( $2950\text{ cm}^{-1}$ ) e vibração das ligações N-H de amidas secundárias ( $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ). A banda característica do grupo N=C=O livre residual próxima a  $2270\text{ cm}^{-1}$  não é observada, o que confirma a reação total entre os grupos NCO do diisocianato com a PCL, PEG e o extensor de cadeia utilizados na síntese da dispersão de poliuretano. Isso é vantajoso, visto que grupos NCO livres podem gerar reações secundárias indesejáveis, formando ligações cruzadas que tornariam o polímero mais rígido.

A policaprolactona (PCL) apresenta ligações lábeis de éster alifáticos, que podem ser hidrolisados no ambiente biológico. No entanto, a taxa de degradação do PCL isoladamente é bastante lenta devido à sua hidrofobicidade e estrutura semi-cristalina. Para adaptar a velocidade de biodegradação do poliuretano, o polietilenoglicol (PEG) pode ser também introduzido como um comonômero do segmento flexível, aumentando a hidrofilia e a absorção aquosa, o que leva a maiores taxas de biodegradação.

A figura 25 (a, b e c) apresenta os espectros de infravermelho dos produtos de degradação dos implantes de PUD contendo PCL e PEG como segmentos flexíveis em diferentes estágios de degradação. O estudo de degradação foi realizado a  $37^\circ\text{C}$  e pH 7,4 durante dois meses.

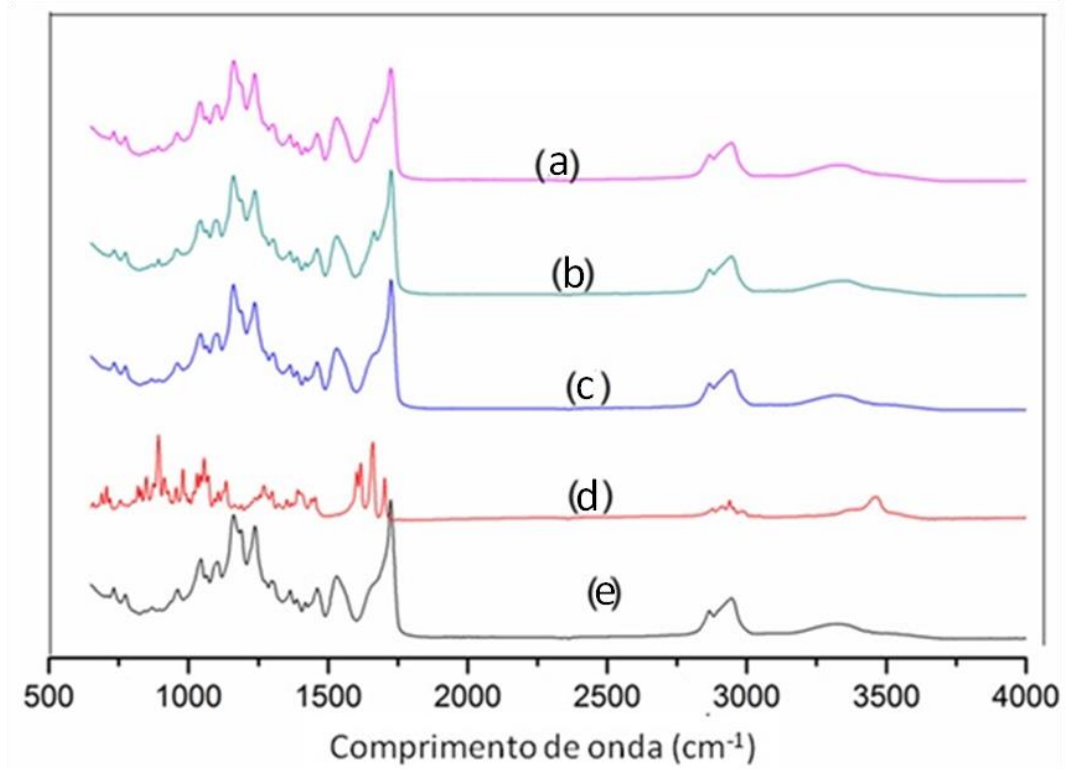


**Figura 25 - Espectros de absorção no infravermelho de amostras de PUD após o estudo de degradação *in vitro*: a) PUD após 2 meses de degradação; b) PUD após 20 dias de degradação; c) filme de PUD após 2 meses de degradação d) filme de PUD não degradado.**

Nas amostras dos produtos de degradação do PUD com 20 dias e 2 meses de degradação (espectro a e b da Figura 25), assim como no espectro relativo ao implante de PUD após 2 meses de degradação (Figura 25c) foi verificado que as bandas de absorção características do implante de PUD forma preservadas durante a degradação. Entretanto, observou-se um aumento na intensidade da banda em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , indicando o aumento de grupos carbonila livres. Pode ser notada uma banda adicional em aproximadamente  $3360\text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibrações de estiramento de grupos OH livres que não estava presente no espectro do implante de PUD não degradado. Também pode ser observada uma banda em aproximadamente  $1632\text{ cm}^{-1}$  possivelmente relativa à vibração de grupos carbonila de ácidos carboxílicos obtidos da hidrólise de ligações éster. Poliuretanos são

susceptíveis à degradação principalmente devido à quebra hidrolítica de ligações presentes nos seus segmentos flexíveis. A degradação de ligações uretano dos segmentos rígidos em aminas também foi reportada, o que explica o aumento da banda relativa a aminas primárias livres.

A figura 26 apresenta os espectros no infravermelho da DX pura e dos filmes de PUD contendo diferentes concentrações de DX. A DX pura (Figura 26d) apresentou bandas de absorção características relativas à deformação axial de ligações de hidrogênio ( $3400 - 3675 \text{ cm}^{-1}$ ), deformação axial de C-H aromáticos ( $3020 - 3050 \text{ cm}^{-1}$ ), estiramento de grupos carbonila de éteres e cetonas ( $1745 - 1723 \text{ cm}^{-1}$ ) e deformação do grupo C-F ( $\sim 882 \text{ cm}^{-1}$ ). Comparando os espectros da DX incorporada na matriz polimérica de PUD podemos observar que as principais bandas da DX foram preservadas além de não terem sido formados grupos adicionais mesmo alterando-se a concentração de DX. Estes resultados sugerem que o aumento da concentração de DX não interfere na estabilidade nem do fármaco nem do polímero. Estes resultados também indicam que o fármaco foi incorporado com sucesso no PUD e que os principais grupos químicos da DX foram preservados durante o processo de desenvolvimento dos filmes.

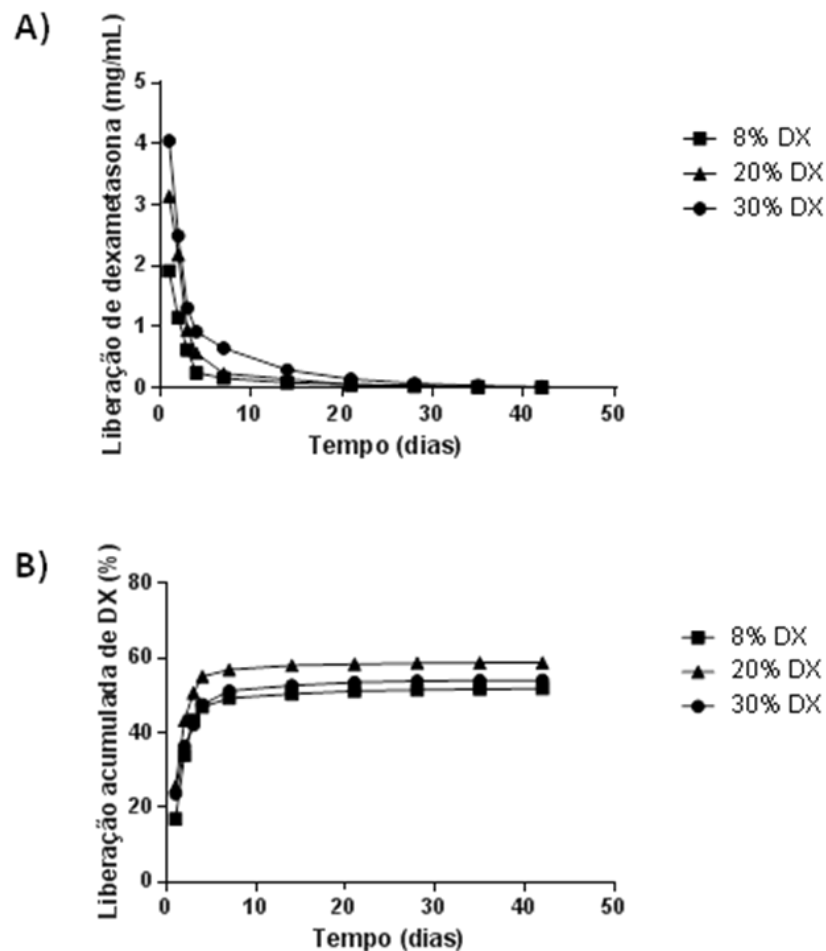


**Figura 26** - Espectro de absorção no infravermelho de amostras de PUD contendo DX em diferentes concentrações: a) PUD DX 8%; b) PUD DX 20%; c) PUD DX 30%; d) DX pura; e) filme de PUD branco.

#### 8.4 Teste de liberação

O estudo de liberação *in vitro* da DX a partir dos filmes de PUD obtidos foi realizado com o intuito de se determinar o perfil de liberação do fármaco e avaliar se o método de obtenção dos sistemas é reproduzível. O método fundamenta-se na tentativa de simular o meio fisiológico em que os sistemas serão aplicados, adotando-se as condições experimentais descritas anteriormente (2,0 mL de PBS pH 7,4 à 37°C). Para tal, foram utilizados implantes cortados em quadrados de 1 cm<sup>2</sup>.

O perfil de liberação acumulada (%) assim como o perfil de liberação em mg/mL em função do tempo (dias) da DX encontram-se representados na Figura 27.



**Figura 27** - Perfil de liberação de DX dos filmes de PUD contendo 8, 20 e 30% do fármaco (n=6). A) Concentração de DX em função do tempo (mg/mL); B) Liberação acumulada (%).

Diferentes concentrações de DX foram veiculadas nas matrizes de PUD afim de se observar o efeito desta variável na degradação polimérica e na velocidade de liberação do fármaco. Um *burst* inicial seguido de uma fase de liberação constante do fármaco foi observado. Neste estudo, o uso do PEG como segmento flexível para poliuretanos teve um efeito tanto na solubilidade do fármaco quanto na hidrofiliabilidade do sistema de PUD, o que levou à liberação de no mínimo 50% da DX em todas as curvas após 7 dias (49,2%, 56,8% e 51,2% de liberação do fármaco para os implantes de 8, 20 e 30% de DX, respectivamente). Uma vez que a doença alvo é a uveíte aguda, o *burst* inicial é altamente desejável.

A presença de PEG (como formador de poros ou como uma parte do segmento flexível) afeta tanto a solubilidade do fármaco quanto a hidrofiliabilidade do PU,

levando ao aumento da velocidade de liberação. Uma possível explicação para isso é que a presença do PEG resulta na formação de canais de difusão do fármaco, além de aumentar a solubilidade deste na matriz de PU.

Não foram observadas diferenças significativas no perfil das curvas de DX a 8, 20 e 30%. A liberação do fármaco de sistemas poliméricos se refere ao processo em que as moléculas do fármaco migram da matriz polimérica para o meio de liberação e é controlada pela composição do polímero, inchaço e concentração inicial do fármaco. Estes resultados sugerem que a liberação da DX da matriz de PUD é controlada principalmente pela degradação do polímero, provando que o aumento da concentração de DX não interfere no perfil de liberação, o que qualifica o sistema para a veiculação de diferentes concentrações do fármaco.

O terceiro estágio correspondente a um pico de liberação da DX causado pelo inchamento e erosão do polímero não foi observado nas curvas, apesar do inchamento da matriz de PUD nem sempre levar ao aumento da velocidade de liberação do fármaco.

Ao final do estudo foi observada a liberação de 51,7%, 58,7% e 54,1% de DX a partir dos filmes de 8, 20 e 30% de fármaco, respectivamente. Estudos posteriores devem ser realizados afim de se avaliar o perfil de liberação destes filmes por tempos superiores a 50 dias.

Moura e colaboradores (2011) desenvolveram um sistema de liberação de dexametasona a partir de poliuretano sintetizado com IPDI, PCL e PEG, que foi implantado subcutaneamente em camundongos. A matriz apresentou cinética de liberação aproximadamente igual a zero do fármaco hidrofóbico, por 120 e 45 dias de liberação *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Resultados similares foram encontrados por Da Silva e colaboradores (2011), que prepararam um poliuretano-ureia a partir de IPDI, PCL e hidrazina para a veiculação de acetato de dexametasona (Da Silva et al. 2011).

A liberação de fármacos dispersos em matrizes de PU (e não ligadas covalentemente à cadeia) é dependente da quantidade de fármaco e da sua solubilidade na matriz, assim como da velocidade de degradação e absorção de água das matrizes poliméricas.

A velocidade de liberação do fármaco também pode ser modulada pela degradação do polímero e pela diminuição da sua temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>). O aumento da temperatura leva ao aumento da mobilidade das cadeias poliméricas e da difusão do fármaco. Além disso, as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas entre o PU e o fármaco são mais fracas sob aquecimento.

### **8.5 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos produtos de degradação dos implantes de PUD contendo dexametasona**

As células ARPE-19 foram incubadas em contato direto com os produtos de degradação dos implantes de PUD-DX (30%) após 4 meses de acumulação em PBS. Após 1 e 4 dias de tratamento, as células ARPE-19 apresentaram  $96,69 \pm 2,27\%$  e  $91,1 \pm 0,6\%$  de viabilidade, respectivamente, quando comparadas com o controle.

A partir da análise preliminar desses resultados pode-se inferir que dentro do tempo de degradação testado, 4 meses, os implantes de PUD-DX (30%) não apresentam um efeito citotóxico significativo, sugerindo que o tratamento prolongado poderia ser seguro para tecidos oculares (células do epitélio pigmentado da retina).

Resultados semelhantes foram descritos por Da Silva e colaboradores (2010), que avaliaram a toxicidade em células da retina (ARPE-19) dos produtos de degradação do PU contendo PCL e PEG como cadeias flexíveis após 4 meses de degradação, não sendo observada nenhuma alteração na viabilidade celular assim como nenhum sinal de toxicidade.

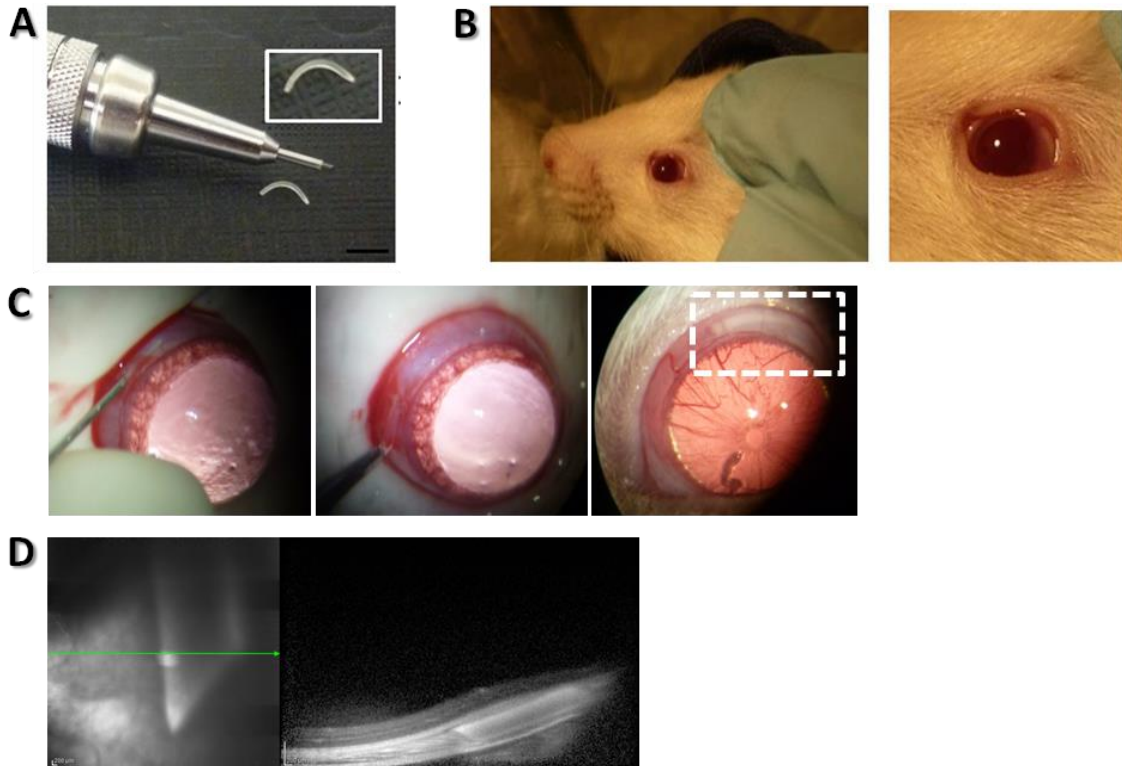
Além da importância da biocompatibilidade dos produtos de degradação do poliuretano, a capacidade de biodegradação deste polímero representa uma característica importante no desenvolvimento de dispositivos poliméricos implantáveis para uso oftálmico, uma vez que estes não seriam removidos da cavidade vítrea após a completa liberação do agente terapêutico no local de ação.

## 8.6 Inserção dos sistemas no espaço supracoroidal

Os filmes de PUD branco e PUD DX foram inseridos no espaço supracoroidal de 12 animais (n=6). A figura 28B apresenta o filme de PUD DX desenvolvido, de espessura e comprimentos iguais a 0,5 e 3,0 mm, respectivamente. Essa pequena espessura é necessária para que não haja a ruptura da coróide e da retina após a inserção. A técnica cirúrgica realizada para inserção dos filmes poliméricos no espaço supracoroideano é demonstrada na figura 28A e 28C, onde se observa a realização de uma incisão na região da *pars plana*, para a inserção do implante entre a esclera e a coróide. Para verificar se o posicionamento do implante foi bem realizado, logo após a cirurgia foi feita uma tomografia de coerência óptica (OCT), onde se pode observar a integridade da retina, a ausência de hemorragia coroidal ou subretiniana. Nos dias posteriores à cirurgia não foi observado a formação de edema retiniano na região próxima ao polímero, assim como a presença substâncias no espaço subretiniano, além da ausência de qualquer sinal inflamatório na região anterior e posterior do olho (Figura 28D).

A possibilidade de utilização do espaço supracoroidal como nova via para administração de fármacos foi também mostrada por Einmahl e colaboradores (2002) ao realizarem injeções de diferentes formulações baseadas no poli(orto éster) (POE), um polímero viscoso e biodegradável em olhos de coelhos. Foram injetadas com sucesso formulações de POE puro e POE contendo 1% (p/p) de fosfato de dexametasona, não sendo observados sinais inflamatórios e alterações na estrutura das camadas oculares adjacentes ao polímero.





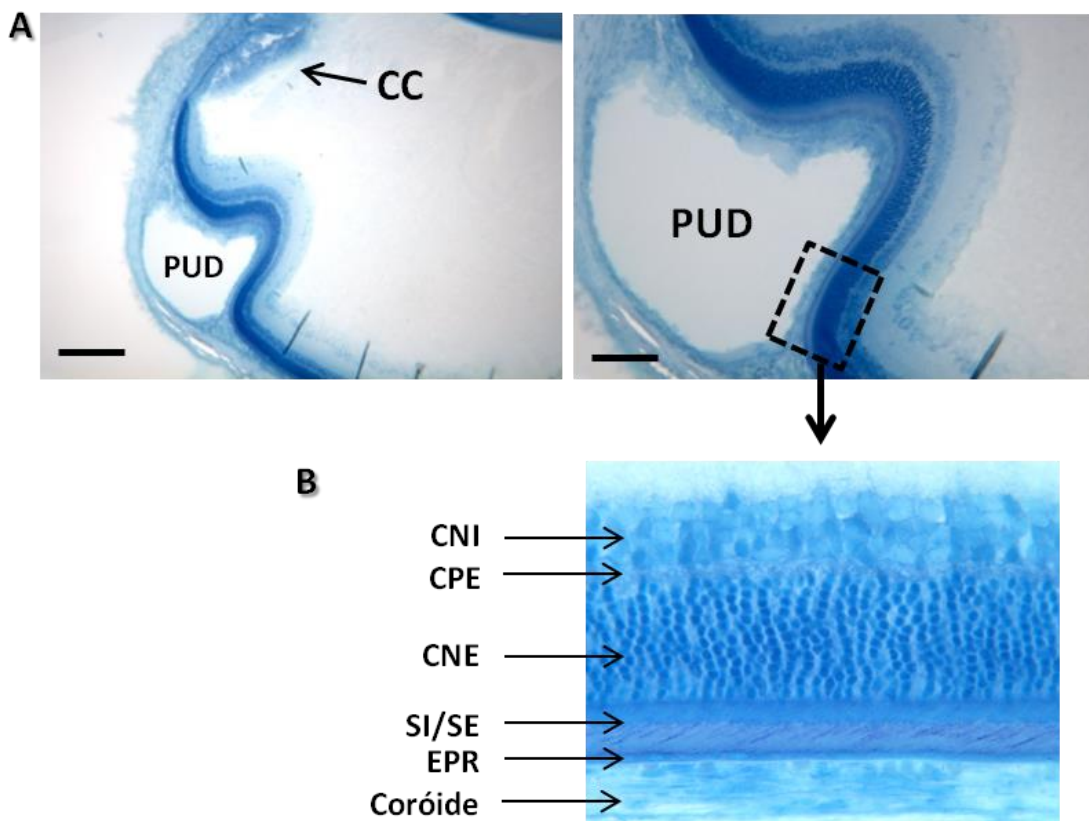
**Figura 28 - Validação da técnica de inserção do filme polimérico. (A) Filme de PUD-DX que foi implantado; (B) Ausência de hemorragia após inserção cirúrgica dos filmes nos olhos de ratos Lewis; (C) Etapas da cirurgia: incisão na esclera e coróide, inserção do filme entre a coróide e a retina, localização do filme após a sua completa inserção; (D) Imagem da tomografia de coerência óptica (OCT) mostrando a localização do filme no espaço supracoroidal, sem danos aos tecidos adjacentes.**

Gilger e colaboradores também utilizaram este espaço para a veiculação de um sistema biodegradável de PCL e ciclosporina para o tratamento de uveíte recorrente em equinos (Gilger et al. 2006, 2010). Os sistemas disponibilizaram elevados níveis do fármaco na maioria dos tecidos oculares, como corpo ciliar, coróide, retina e nervo óptico. Os animais, monitorados por 3 anos, apresentaram tolerância ao sistema e uma diminuição significativa dos episódios de uveíte.

As vantagens desta via de administração de princípios ativos incluem os seguintes fatos: (1) fármacos não necessitam de atravessar a esclera; (2) os fármacos podem ser liberados diretamente na coróide e potencialmente na retina, sem a necessidade de inserção na cavidade do vítreo; (3) alta biodisponibilidade dos fármacos nos tecidos intraoculares; (4) não obstrução do eixo visual (Rai *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2014).

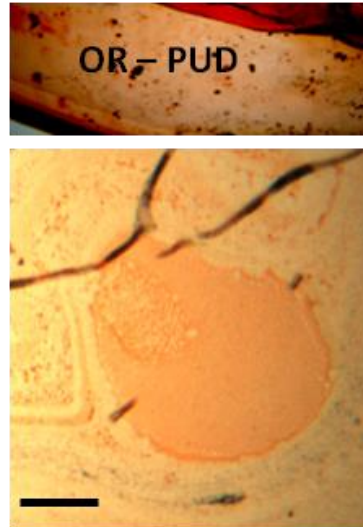
### 8.7 Estudo da biocompatibilidade *in vivo* dos filmes de PUD e PUD-DX

A biocompatibilidade e a tolerância dos implantes foram confirmadas pelas análises histológicas. Na Figura 29 podemos observar a ausência de sinais inflamatórios após 15 dias da inserção dos filmes, como a inexistência de infiltração de células inflamatórias e hemorragia nas áreas próximas ao polímero, assim como a integridade das camadas e células da neuroretina e da coróide.



**Figura 29 - A)** Cortes histológicos dos olhos de ratos Lewis após 15 dias da implantação do filme PUD DX 30% no espaço supracoroidal, barra = 350  $\mu\text{m}$  e 140  $\mu\text{m}$ . CC: corpo ciliar; **B)** Imagem da retina, evidenciando a integridade de suas camadas. CNI: camada nuclear interna; CPE: camada plexiforme externa; CNE: camada nuclear externa; SI/SE: segmentos internos e externos; EPR: epitélio pigmentado da retina.

Na figura 30 está representado o corte histológico cuja lâmina foi corada com *oil red*, com o objetivo de se confirmar a presença do polímero no espaço indicado:



**Figura 30** - Coloração com *oil red*, confirmando a presença do polímero. Barra = 140  $\mu\text{m}$ .

Considerando-se que a arquitetura da retina foi conservada, sugere-se que não houve nenhuma degeneração de fotorreceptores causada pela ruptura das células de epitélio pigmentado da retina. Portanto, as camadas da retina não sofreram atrofia na presença dos implantes poliméricos, da dexametasona liberada e dos subprodutos do poliuretano, indicando que não houve toxicidade para a neuroretina.

Além disso, a inexistência da citotoxicidade *in vitro* para as células ARPE-19 (conforme mencionado anteriormente) corroboram com a biocompatibilidade ocular *in vivo* encontrada para os sistemas poliméricos, seus produtos de degradação e a dexametasona.

A dexametasona e outros corticóides são habitualmente utilizados para tratar a inflamação ocular localizada no segmento posterior do olho. Os corticóides exercem efeitos rápidos sobre o edema da retina, no entanto, eles estão associados com potenciais efeitos adversos na câmara posterior do olho, incluindo a redução da vascularização da coróide e uma redução na densidade vascular da retina durante o seu desenvolvimento. Considerando esses potenciais efeitos adversos vasculares, especial atenção deve ser dada ao desenvolver dispositivos intraoculares de liberação prolongada contendo estes fármacos. Neste estudo, as imagens *in vivo* da tomografia de coerência óptica (OCT) dos olhos que receberam implantes DX-PUD durante 15 dias, não revelou qualquer sinal de toxicidade vascular da retina e

coróide, sendo assim, sugere-se que as doses de dexametasona liberadas dos implantes de PUD, mantiveram-se abaixo do limiar tóxico para as células endoteliais.

## **8.8 Estudo da atividade anti-inflamatória dos filmes de PUD DX em modelo animal de uveíte - Modelo EIU (*endotoxin-induced uveitis*)**

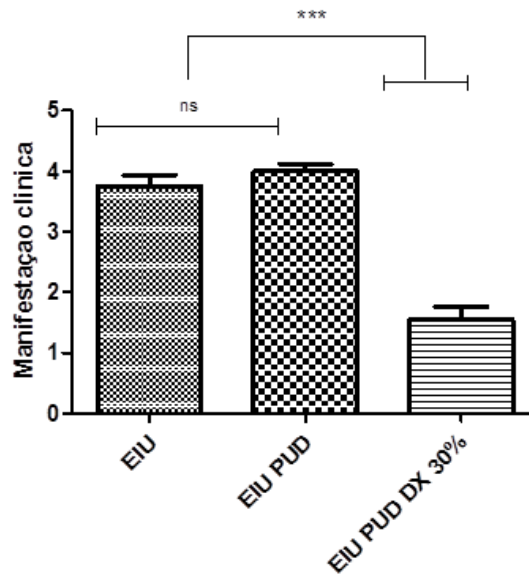
Após 24 horas da injeção subcutânea de 100  $\mu$ L de solução salina contendo 200  $\mu$ g de LPS, a inflamação aguda no segmento anterior do olho atingiu a sua intensidade máxima. Os 18 animais foram então avaliados clinicamente e após este tempo foram sacrificados e os olhos enucleados para as análises posteriores.

### **8.8.1 Avaliação da resposta inflamatória**

A uveíte e o edema macular resultante da sua progressão são caracterizados pela quebra da barreira hemato-ocular (BHO). Os corticosteroides apresentam propriedades antiinflamatória, antiangiogênica e a capacidade de estabilizar a BHO.

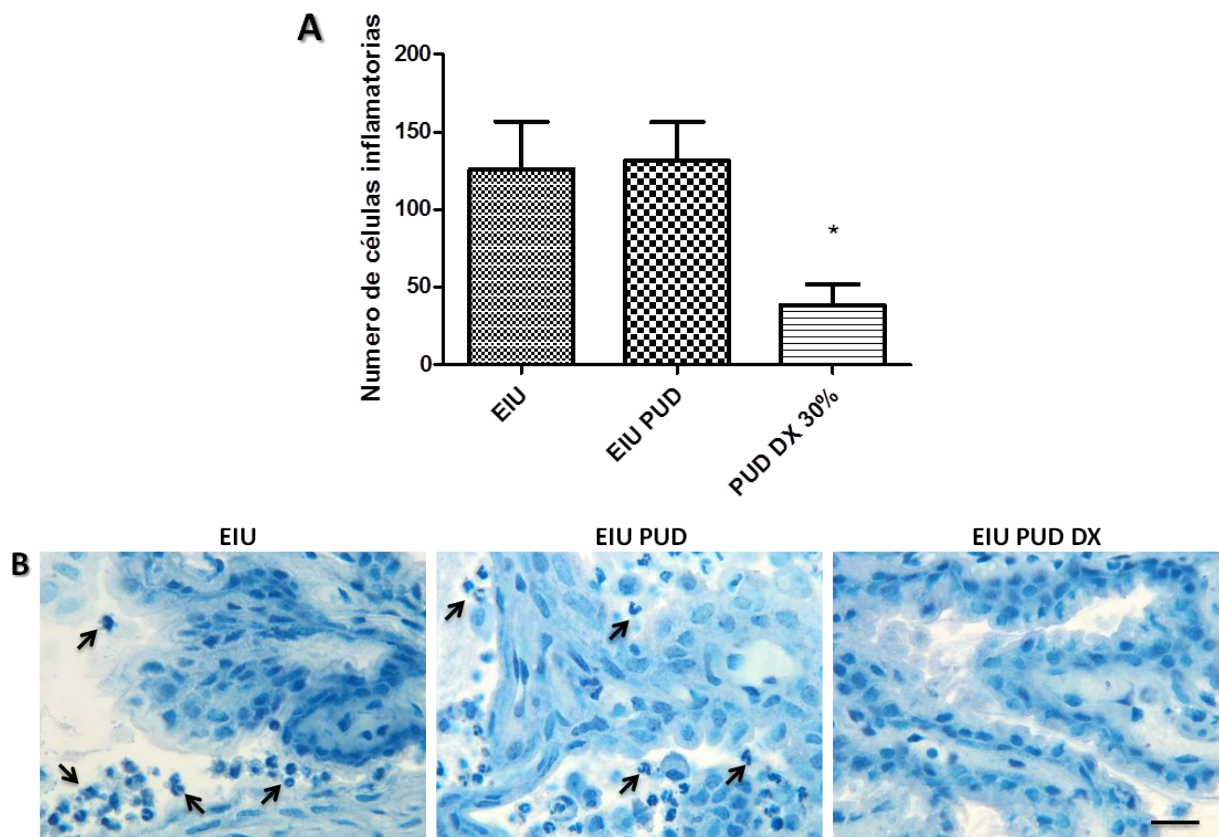
A intensidade da resposta inflamatória foi classificada por meio de avaliação clínica, em uma escala de 0 a 5, como descrito previamente: 0, ausência de inflamação; 1, vasodilatação mínima da íris e conjuntiva, com ausência de células na câmara anterior; 2, vasodilatação moderada da íris e conjuntiva, com ausências de células na câmara anterior; 3, vasodilatação intensa da íris e menos de 10 células por campo na câmara anterior; 4, sinais clínicos mais severos, mais de 10 células por campo; 5, reação inflamatória intensa, formação de fibrina na câmara anterior.

O grupo tratado com PUD DX 30% ( $1,55 \pm 0,69$ ) apresentou redução significativa na manifestação clínica da inflamação, quando comparado ao grupo controle (somente EIU) ( $3,75 \pm 0,66$ ) e ao grupo que recebeu o filme de PUD sem a DX ( $4 \pm 0,43$ ) (Figura 31). Entre esses dois últimos grupos não houve diferença significativa, indicando que a DX presente no implante é a responsável pela melhora clínica dos animais.



**Figura 31** - Avaliação clínica dos animais submetidos à indução da uveíte anterior pela injeção subcutânea de LPS (EIU). EIU: grupo controle; EIU PUD: grupo implantado com PUD sem fármaco; EIU PUD DX: grupo implantado com PUD contendo 30% de DX.

Para melhor caracterizar o efeito da DX liberada do implante de PUD na uveíte, as células inflamatórias infiltrantes foram quantificadas nos tecidos oculares dos cortes histológicos. Observou-se que o número de células inflamatórias foi significativamente reduzido nos olhos que receberam o sistema contendo a DX, confirmando o que foi observado na avaliação clínica (Figura 32B).



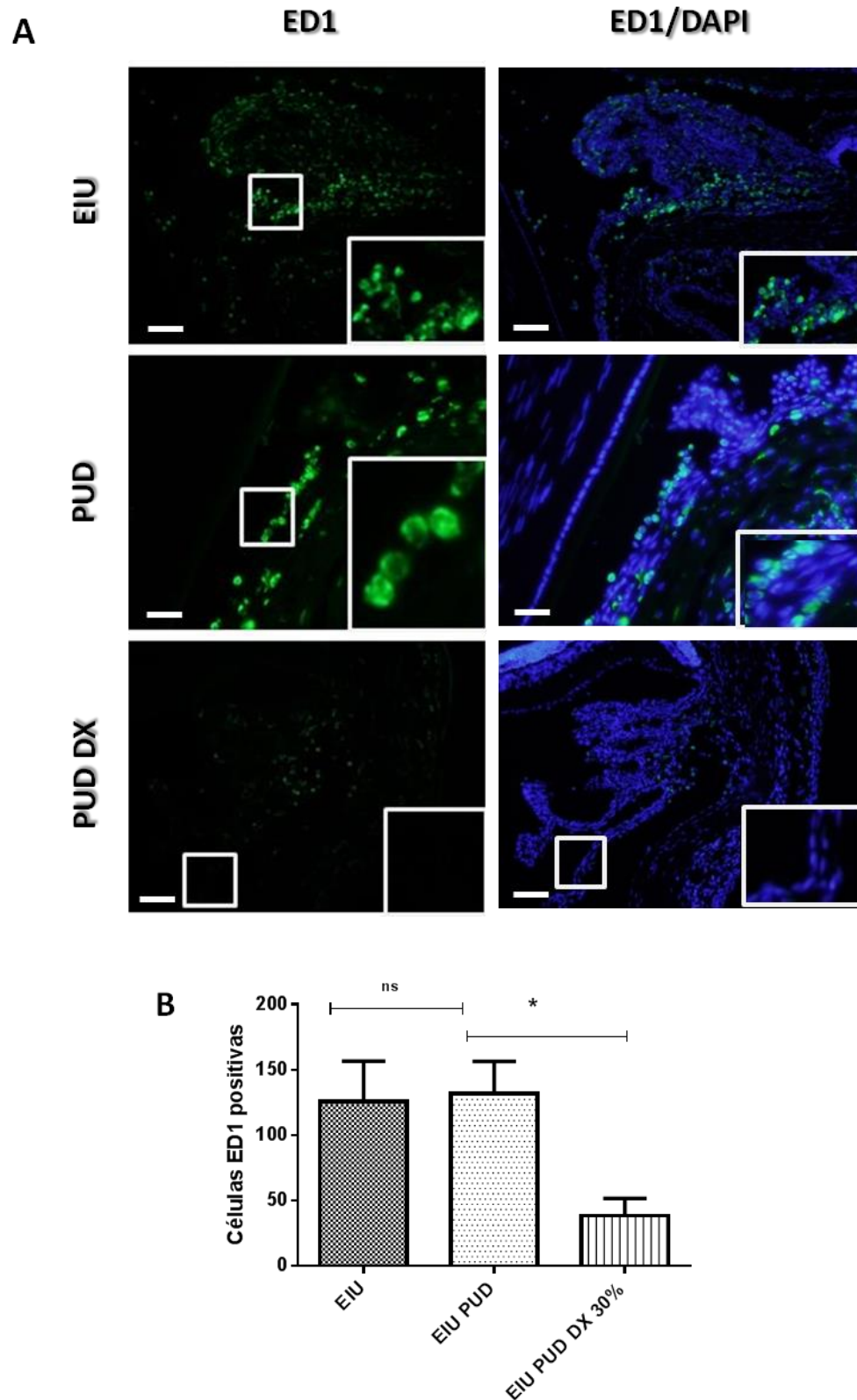
**Figura 32 - A) Contagem de células inflamatórias na região do corpo ciliar e íris; B) Cortes histológicos evidenciando as células inflamatórias. Coloração azul de toluidina. Teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 6$ . Barra = 43,5  $\mu\text{m}$ .**

Os leucócitos polimorfonucleares são as principais células efetoras na inflamação aguda, que migram do sistema vascular em grande número para fagocitar uma grande variedade de partículas presentes nos locais da inflamação. No entanto, eles também contribuem para a produção de citocinas, eicosanoides e fator de ativação de plaquetas e, conseqüentemente, para a manutenção do processo inflamatório. Portanto, a regressão destas células no segmento anterior do olho indicaram que os implantes supracoroidais de PUD-DX foram eficazes no controle da progressão da uveíte.

### **8.8.2 Imunofluorescência**

Para caracterizar o infiltrado inflamatório presente nos olhos dos animais com uveíte (3 olhos por grupo), as lâminas foram marcadas com o anticorpo primário anti-ED1, para monócitos, macrófagos e células dendríticas. Pode-se observar a presença de células inflamatórias (marcadas em verde) na região anterior do bulbo ocular, no corpo ciliar e íris (Figura 33A) em maior concentração nas seções do grupo controle (EIU) em comparação com o grupo tratado com PUD DX. Isso está de acordo com o gráfico presente na figura 33B, referente à contagem de células anti-ED1 positivas. 24 horas após a administração de LPS, o número de células anti-ED1 positivas nos olhos tratados com PUD DX 30% foi significativamente reduzido em comparação com os olhos que receberam os sistemas de PUD branco e controle.

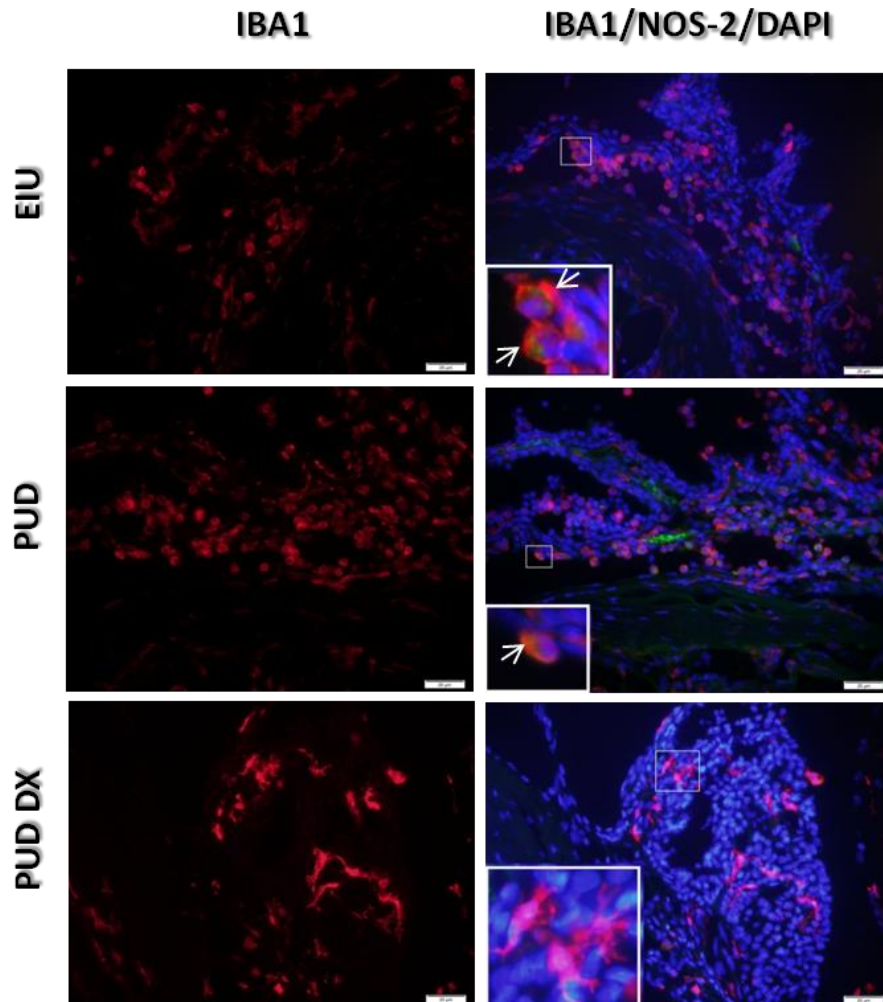
Sabe-se que os leucócitos são capazes de liberar mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, superóxido e enzimas proteolíticas, que perpetuam a inflamação, causam danos às células endoteliais e promovem a quebra da barreira hemato-ocular (Dugel *et al.*, 2015). A redução da infiltração destas células inflamatórias, observada na histologia e na imunofluorescência dos animais tratados com o implante de PUD-DX, é um resultado que sugere a eficácia do tratamento da inflamação ocular.



**Figura 33** – (A) Marcação de macrófagos via anticorpo secundário anti-ED1 (verde); contraste de núcleos em azul (DAPI). (B) Contagem de células ED-1 positivas na região do corpo ciliar e íris. Barra = 20  $\mu$ m.



Com o objetivo de avaliar o efeito da DX veiculada no filme de PUD na ativação da microglia e recrutamento macrófágico, foi realizada a marcação das lâminas com o anticorpo anti-IBA1 (rosa - específico para microglia e macrófagos). As células IBA1 positivas arredondadas representam células ativadas enquanto as ramificadas são células não ativadas. Nos olhos tratados com o implante de DX, a maioria das células da microglia no corpo ciliar e íris apresentam o formato ramificado quando comparadas com os animais dos grupos controle e PUD sem fármaco, cujas células IBA1 positivas apresentam-se em maior parte com forma arredondada (Figura 34).



**Figura 34 –** Marcação de microglia e macrófagos com anti-IBA1 e anti-NOS2. Observa-se que a maioria das células IBA1 positivas nos grupos EIU e PUD branco apresentam formado arredondado, ou seja, estão ativadas, ao contrário das células do grupo PUD DX que apresentam forma ramificada (não ativadas). A expressão de NOS-2 pelas células IBA1 positivas também foi avaliada pela co-marcação com anti-NOS2. Observa-se no detalhe, que a DX reduziu a expressão de NOS2 pela microglia. As setas indicam as áreas da co-marcação (pontos alaranjados), presentes nos grupos sem DX. Barra = 20  $\mu$ m.

Também foi realizada a co-marcação das lâminas com anti-IBA1 e anti-NOS2 (verde) (Figura 34). Observou-se que o NOS2 não foi expresso pela microglia nos olhos tratados com DX, mas foi expresso pelas células IBA1 positivas dos outros grupos, sendo isso mais uma importante evidência da supressão da inflamação da úvea anterior pelos dispositivos implantáveis. A expressão do NOS2 por células residentes infiltrantes poderia contribuir para a ruptura da barreira hemato-aquosa neste modelo de doença.

### **8.8.3 PCR em tempo real**

O modelo de uveíte (EIU) estabelecido é considerado uma inflamação da úvea anterior, no entanto, coroidite, vitrite, hemorragia da retina, e infiltração de células inflamatórias da retina poderiam estar presentes. As células da retina lesada, tais como as células do epitélio pigmentado, são capazes de expressar citocinas pró-inflamatórias que podem levar à atrofia dessas células, a quebra da barreira hemato-ocular e o aumento da permeabilidade vascular.

Neste estudo, a expressão de mRNA de diversos mediadores pró e anti-inflamatórios foi determinada por PCR em tempo real do corpo ciliar e da retina dos três grupos estudados.

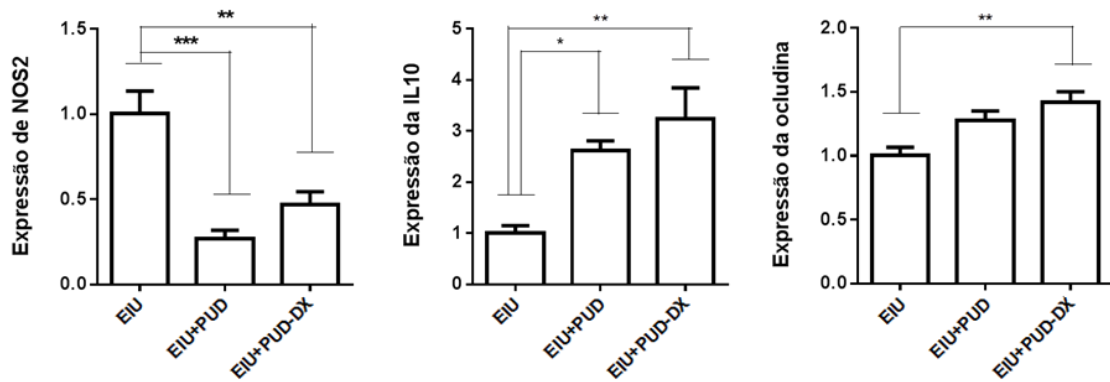
Como pode ser observado na Figura 35, a expressão das citocinas pró inflamatórias IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  foi significativamente reduzida no grupo tratado com PUD DX, quando comparado ao grupo controle. Sendo assim, as camadas da retina apresentaram-se completamente preservadas, bem como a função visual do animais.

Um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes já identificados é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), um potente fator de permeabilidade vascular produzido por macrófagos, linfócitos T, células tumorais e, no olho, pelas células do EPR. O grupo tratado com PUD DX apresentou uma diminuição significativa na expressão de VEGF em relação ao grupo controle, o que contribuiu para a manutenção da integridade da barreira hematorretiniana.

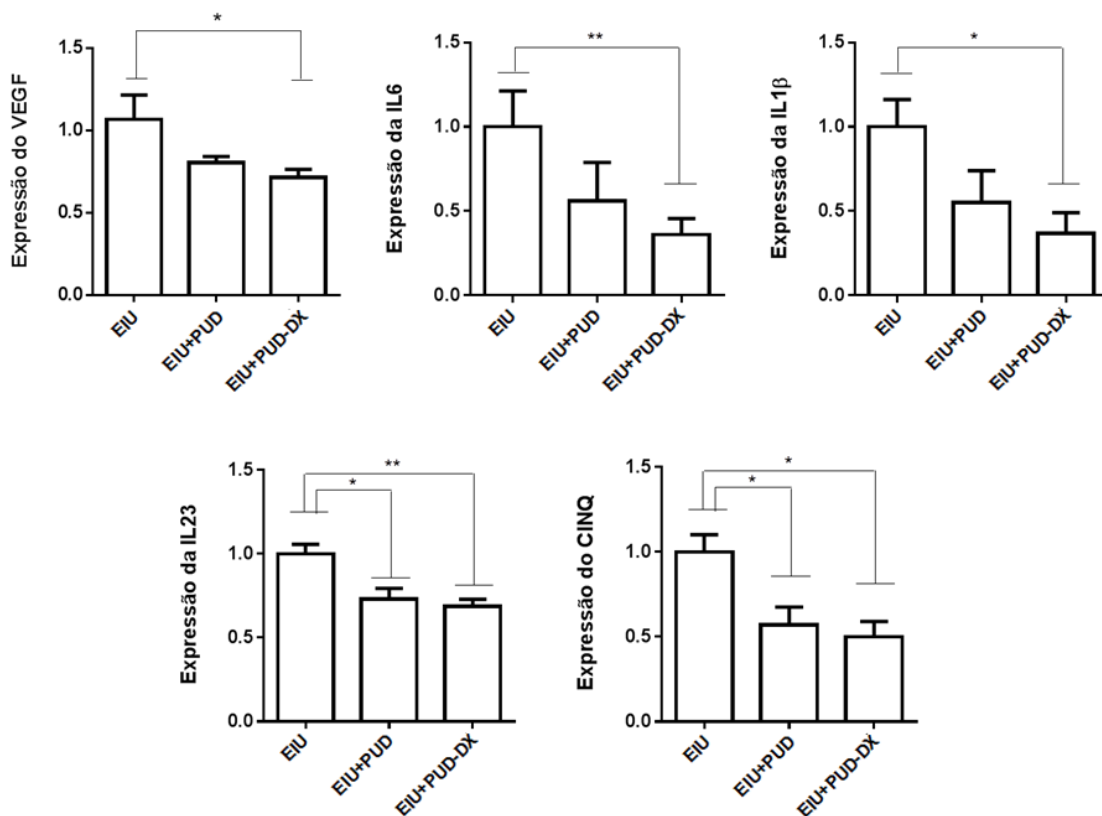
Altos níveis de VEGF no vítreo presentes na uveíte, levam à uma diminuição dos níveis de ocludina, proteína fundamental nas junções intercelulares dos vasos da retina, podendo assim, contribuir para o aumento da permeabilidade vascular e consequentemente, quebra da BHR (Dugel *et al.*, 2015). Foi observado que o filme de PUD DX levou a um aumento da expressão da ocludina, efeito contrário ao VEGF, promovendo a integridade das junções de oclusão e consequentemente, podendo favorecer a restauração da BHR.

O fator quimiotático CINC-1 é uma quimiocina responsável pela infiltração de células polimorfonucleares, cuja secreção é induzida pelo LPS na EIU, e por várias outras citocinas como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Guex-Crosier *et al.*, 1996). Tanto o PUD DX quanto o PUD branco promoveram a redução da expressão de CINC, contribuindo para a diminuição da infiltração de células inflamatórias.

### A Expressão das citocinas no corpo ciliar/íris



### B Expressão das citocinas na retina



**Figura 35** – Análise da expressão de mRNAs de IL-6, IL-23, IL-1 $\beta$ , NOS-2, IL-10, ocludina, VEGF e CINC-1 determinadas por PCR em tempo real de células do corpo ciliar e da retina de animais do grupo controle e dos grupos PUD e PUD DX. Teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pos-teste de Dunn. \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ .

O NOS2 é considerado o mediador chave na patogênese da uveíte. A expressão de NOS2 foi significativamente reduzida nos animais dos grupos PUD sem fármaco e PUD DX, em relação ao grupo controle. Comparando-se esse resultado com a coloração com os anticorpos anti-NOS2 e anti-IBA1 realizada nas análises imunohistoquímicas, pode-se observar que nos animais nos quais foi administrado o PUD DX houve a inibição da expressão do NOS2 pelas células IBA1 positivas, confirmando assim, o efeito inibitório da DX na expressão de NOS2.

Além disso, houve um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, indicando que a DX liberada do filme de PUD promoveu não só a redução de mediadores pró-inflamatórios como aumentou a expressão de mediadores anti-inflamatórios.

Como pode ser observado na Figura 35 o PUD sem fármaco também levou à redução da expressão de mediadores pró-inflamatórios, como IL-23, CINC e NOS 2, assim como aumentou a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Estes resultados são extremamente relevantes, corroborando para a utilização deste polímero como matriz para a liberação prolongada de fármacos nos tecidos oculares.

Além disso, como foi visto nos resultados anteriores, apenas o grupo tratado com PUD DX apresentou melhora nos sinais clínicos da uveíte, assim como redução das células inflamatórias na análise histopatológica, redução do número de células ED1 positivas, redução do número de células IBA1 positivas ativadas (arredondadas) e também diminuição da expressão de NOS2 pelas células IBA1 positivas. Assim pode-se concluir que a presença da DX é essencial para a eficácia do sistema.

O espaço supracoroidal, situado entre a esclera e a coróide, tem sido usado sem complicações como local para a liberação de fármacos para o segmento posterior do olho (Behar-Cohen *et al.*, 1997; Gilger *et al.*, 2010). As vantagens deste espaço incluem o fato dos fármacos não necessitarem passar pela barreira escleral e serem liberados diretamente na coróide e potencialmente na retina, sem a necessidade da inserção na cavidade vítrea.

Diversos polímeros biodegradáveis têm sido propostos para a veiculação de fármacos neste espaço e em outras áreas dos tecidos oculares. Os polímeros

derivados do ácido lático e glicólico têm sido extensamente utilizados nos últimos 30 anos. Entretanto, esses polímeros se apresentam como sistemas rígidos, podendo levar ao mal funcionamento dos implantes, assim como danificar os tecidos oculares moles, ocasionando processos inflamatórios (Da Silva *et al.*, 2011). Os poliuretanos biodegradáveis apresentam-se como uma alternativa importante devido às suas características elásticas, sendo menos agressivos mecanicamente e de implantação mais fácil, além da sua síntese não utilizar solventes orgânicos, reduzindo o risco de efeitos tóxicos.

## 9 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi mostrado pela primeira vez a viabilidade e a segurança da inserção de um filme de poliuretano capaz de disponibilizar fármacos no espaço supracoroidal. Os produtos de degradação do poliuretano não apresentaram toxicidade para as delicadas estruturas do olho. O filme biodegradável de PUD contendo a DX foi capaz de liberar doses efetivas do fármaco, inibindo a resposta inflamatória característica da uveíte anterior por meio da diminuição da expressão de fatores pró-inflamatórios e aumento na expressão de fatores anti-inflamatórios, condizendo com a redução do número de células inflamatórias na câmara anterior e também com desativação de monócitos e células da microglia observada nos experimentos. A regulação desses parâmetros inflamatórios evidenciaram a eficácia terapêutica do implante supracoroidal de PUD-DX em suprimir a uveíte. Assim, o implante desenvolvido se torna um sistema promissor no tratamento de doenças inflamatórias oculares.

## 10 PERSPECTIVAS

A fim de dar continuidade ao trabalho, pretende-se realizar o eletrorretinograma dos ratos após a inserção dos sistemas, com o objetivo de avaliar se o uso dos implantes leva a alguma alteração na função retiniana dos animais. Além disso, iremos realizar a quantificação da dexametasona do humor vítreo e aquoso dos animais para determinar a farmacocinética da liberação do fármaco dos sistemas desenvolvidos. Também serão realizados experimentos afim de compreender os mecanismos de regulação das citocinas pelo poliuretano sem fármaco.



**BIBLIOGRAFIA**

AL-ALAFI, A M. Nanocarriers f nanotechnology in retinal diseases. **Journal of Ophthalmology**, v. 28, p. 304-309, 2014.

ANESI, S D; FOSTER, STEPHEN, C. Anterior Uveitis: Etiology and Treatment. **Advanced Ocular Care**, 2011.

AYRES, Eliane. **Poliuretanos e nanocompósitos biodegradáveis derivados de dispersões aquosas projetados para aplicações biomédicas**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

BEHAR-COHEN, F; PAREL, J M; POULIQUEN, Y; *et al.* Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats. **Experimental Eye Research**, v. 65, n. 4, p. 533–45, 1997.

BEHAR-COHEN, F; KOWALCZUK, L; KELLER, N; *et al.* Anatomie de la rétine. **EMC - Ophtalmologie**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2009.

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. e49036, 2012.

BOUSQUET, E; ZHAO, M; THILLAYE-GOLDENBERG, B; VIEIRA, L; CASTANEDA, B; NAUD, M C; BERGIN, C; BESSON-LESCURE, B; BEHAR-COHEN, F; KOZAK, Y. Choroidal Mast Cells in Retinal Pathology : A Potential Target for Intervention. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 8, p. 2083-2095, 2015.

BRON, A; TRIPATH, R; TRIPATH, B. **Anatomy of the eye and orbit**. 8. ed. London, 1997.

CHEN, M; LI, X; LIU, J; HAN, Y; CHENG, L. Safety and pharmacodynamics of suprachoroidal injection of triamcinolone acetonide as a controlled ocular drug release model. **Journal of Controlled Release**, v. 203, p. 109-117, 2015.

CHERNG, J Y; HOU, T Y; SHIH, M F; *et al.* Polyurethane-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1-2, p. 145–62, 2013.

COCA-PRADOS, M. The blood-aqueous barrier in health and disease. **Journal of Glaucoma**, v. 23, n. 8, 2014.

DA SILVA, G R; SILVA-CUNHA, A; AYRES, E; *et al.* Effect of the macromolecular architecture of biodegradable polyurethanes on the controlled delivery of ocular drugs. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 481–7, 2009.

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

DA SILVA, G R; SILVA-CUNHA, A; BEHAR-COHEN, F; *et al.* Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 491–499, 2010.

DA SILVA, G R; SILVA-CUNHA, A; BEHAR-COHEN, F; *et al.* Biodegradable polyurethane nanocomposites containing dexamethasone for ocular route. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 414–422, 2011.

DAMATO, E M; ANGI, M; ROMANO, M R; *et al.* Vitreous analysis in the management of uveitis. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 863418, 2012.

DE SMET, M D; 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. 452–70, 2011.

DEL AMO, E M; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3, p. 135–43, 2008.

DELPECH, M C; COUTINHO, F M B. Waterborne anionic polyurethanes and poly(urethane-urea)s: influence of the chain extender on mechanical and adhesive properties. **Polymer Testing**, v. 19, n. 8, p. 939 – 952, 2000.

DOLZ-MARCO, R; GALLEGO-PINAZO, R; *et al.* Noninfectious uveitis: strategies to optimize treatment compliance and adherence. **Clinical Ophthalmology**, v. 9, p. 1477-1481, 2015.

DUGEL, P U *et al.* Dexamethasone intravitreal implant in the treatment of diabetic macular edema. **Clinical Ophthalmology**, v. 9, p. 1321-1335, 2015.

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

EINMAHL, S; SAVOLDELLI, M; D'HERMIES, F; *et al.* Evaluation of a novel biomaterial in the suprachoroidal space of the rabbit eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 5, p. 1533–9, 2002.

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. 530–43, 2010.

EUA. **The United States Pharmacopeia**. 29. ed., 2006.

FIALHO, S L; BEHAR-COHEN, F; SILVA-CUNHA, A. Dexamethasone-loaded poly(epsilon-caprolactone) intravitreal implants: a pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 637–46, 2008.

FIALHO, S L; SILVA-CUNHA, A. 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; REGO, M G B; CARDILLO, J A; *et al.* Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891–896, 2003.

GARWEG, J G; TAPPEINER, C; HALBERSTADT, M. Pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in retinal detachment. **Survey of Ophthalmology**, v. 58, n. 4, p. 321–9, 2013.

GAUDANA, R; ANANTHULA, H K; PARENKY, A; *et al.* Ocular drug delivery. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 12, n. 3, p. 348–60, 2010.

GAUSE, S; HSU, K H; *et al.* Mechanistic modeling of ophthalmic drug delivery to the anterior chamber by eye drops and contact lenses. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2015. Article in press.

GILGER, B C; SALMON, J H; WILKIE, D; *et al.* A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 6, p. 2596–605, 2006.

GILGER, B C; WILKIE, D; CLODE, A B; *et al.* Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 5, p. 294–300, 2010.

GOMES, E C L. **Desenvolvimento e avaliação da viabilidade de implantes intraoculares constituídos de poliuretano biodegradável e bevacizumabe.** Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SUN GROUP, 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.

GUEx-CROSIER, Y; WITTEWER, A J; ROBERGE, F G. Intraocular production of a cytokine (CINC) responsible for neutrophil infiltration in endotoxin induced uveitis. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 80, n. 7, p. 649–53, 1996.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da Terapêutica.** 11. ed., 2006.

HERRERO-VANRELL, R. *et al.* The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 42, p. 27-43, 2014.

HOON, M. *et al.* Functional architecture of the retina: Development and disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 42, p. 44-84, 2014.

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

KIM, J H; JEONG, S Y; JUNG, M H; HWANG, J M. Use of polyurethane with sustained release dexamethasone in delayed adjustable strabismus surgery. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, p. 1450-1454, 2004.

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

KIMURA, H; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica**, v. 215, p. 143–55, 2001.

KLAASSEN, I; VAN NOORDEN, C J F; SCHLINGEMANN, R O. 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.

LARSON, T; NUSSENBLATT, R B; SEN, H N. Emerging drugs for uveitis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 16, n. 2, p. 309–322, 2012.

LEE, S S; HUGHES, P; ROSS, A D; *et al.* Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 2043–53, 2010.

LEE, D J. Intraocular Implants for the Treatment of Autoimmune Uveitis. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, p. 650-666, 2015.

LIN, P; SUHLER, E B; ROSENBAUM, J T. The future of uveitis treatment. **Ophthalmology**, v. 121, n. 1, p. 365–76, 2014.

LLOYD, W; FARAGHER, R G; DENYER, S P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 769–85, 2001.

LOWDER, C; BELFORT, R; LIGHTMAN, S; *et al.* Dexamethasone intravitreal implant for noninfectious intermediate or posterior uveitis. **Archives of Ophthalmology**, v. 129, n. 5, p. 545–53, 2011.

MARBACK, E. F.; PEREIRA, F. F.; OLIVEIRA, R. D. C.; *et al.* Comprovação anatomopatológica da presença de tecido vascular e nervoso evidenciado à ecografia como eco tangencial ao descolamento de coróide: relato de dois casos. **Archives of Ophthalmology**, v. 72, n. 6, p. 811–814, 2009.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; *et al.* Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 3, p. 563 – 580, 1998.

MITRA, A K. **Fundamentals of Ocular Drug Delivery**. 2010.

MOCHIZUKI, M; SUGITA, S; KAMOI, K. Immunological homeostasis of the eye. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 33, p. 10–27, 2013.

MORRISON, P W J; KHUTORYANSKY, V V. Advances in ophthalmic drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 5, n. 12, p. 1297-1315, 2014.

MOSCHOS, M M; GOULIOPOULOS, N S; KALOGEROPOULOS, C. Electrophysiological examination in uveitis: a review of the literature. **Clinical Ophthalmology**, v. 8, p. 199–214, 2014.

MOURA, S A L; LIMA, L D C; ANDRADE, S P; *et al.* Local Drug Delivery System : Inhibition of Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model by Dexamethasone-Loaded Polyurethane Implants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2886–2895, 2011.

PAULA, J S; RIBEIRO, V R C; *et al.* Bevacizumab-Loaded Polyurethane Subconjunctival Implants: Effects on Experimental Glaucoma Filtration Surgery. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 6, p. 566-573, 2013.

PAVESIO, C; ZIERHUT, M; BAIRI, K; *et al.* Evaluation of an intravitreal fluocinolone acetonide implant versus standard systemic therapy in noninfectious posterior uveitis. **Ophthalmology**, v. 117, n. 3, p. 567–75, 575.e1, 2010.

PINTO, F C H; SILVA-CUNHA, A; *et al.* Controlled release of triamcinolone acetonide from polyurethane implantable devices: application for inhibition of inflammatory angiogenesis. **Journal of Material Science: Material Medicine**, v. 23, p. 1431-1445, 2012.

RAI, U D J P; YOUNG, S A; THRIMAWITHANA, T R; *et al.* The suprachoroidal pathway: a new drug delivery route to the back of the eye. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 4, p. 491-495, 2015.

RIBEIRO, P; LADEIRA, S; ISAAC, C; *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Rev Med (São Paulo)**, v. 90, n. 1, p. 47–51, 2011.

ROCHA, R J; LIMA, J E S; GOMES, S R; *et al.* Síntese de poliuretanos modificados por óleo de mamona empregados em materiais energéticos. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 793–799, 2013.

SALIBA, J B; FARACO, A A G; YOSHIDA, M I; *et al.* Development and characterization of an intraocular biodegradable polymer system containing cyclosporine-A for the treatment of posterior uveitis. **Materials Research**, v. 11, n. 2, p. 207–211, 2008.

SALLAM, A; TAYLOR, S R J; LIGHTMAN, S. Review and update of intraocular therapy in noninfectious uveitis. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 22, n. 6, p. 517–22, 2011.

SIQUEIRA, R C; CUNHA, R; MESSIAS, A; SILVA-CUNHA, A; FIALHO, S L; JORGE, R. Retinal Safety and Efficacy of a Dexamethasone Biodegradable

Implant to Treat Macular Edema Associated to Retinal Vein Occlusion: A Phase I/II Clinical Trial. In: ARVO 2013 Annual Meeting, 2013, Seattle. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54: E-Abstract, 2013.

SPAANS, C J. Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2453 – 2460, 2000.

STRAUSS, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. **Physiological Reviews**, v. 85, p. 845–881, 2005.

TAKASE, H; FUTAGAMI, Y; YOSHIDA, T; *et al.* Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 4, p. 1557–61, 2006.

THRIMAWITHANA, T R; YOUNG, S; BUNT, C R; *et al.* Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today**, v. 16, p. 270–7, 2010.

TOUCHARD, E; OMRI, S; NAUD, M C; *et al.* A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase for the treatment of endotoxin-induced uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 9, p. 4683–93, 2010.

WATSON, P G; YOUNG, R D. Scleral structure, organisation and disease. A review. **Experimental Eye Research**, v. 78, n. 3, p. 609 – 623, 2004.

YANG, M M; LAI, T Y Y; LUK, F O J; *et al.* The roles of genetic factors in uveitis and their clinical significance. **Retina**, 2013.

YASIN, M N *et al.* 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.

YASUKAWA, T. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 23, n. 3, p. 253 – 281, 2004.