

GABRIELLA MARIA FERNANDES CUNHA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ELIMINAÇÃO E DA NEUROPROTEÇÃO DOS
FÁRMACOS TRIANCINOLONA ACETONIDA E ACETATO DE DEXAMETASONA EM
OLHOS VITRECTOMIZADOS**

BELO HORIZONTE – MG

FACULDADE DE FÁRMACIA – UFMG

2012

GABRIELLA MARIA FERNANDES CUNHA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ELIMINAÇÃO E DA NEUROPROTEÇÃO DOS
FÁRMACOS TRIANCINOLONA ACETONIDA E ACETATO DE DEXAMETASONA
EM OLHOS VITRECTOMIZADOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Co-orientadora:

Dr^a. Juliana Barbosa Saliba.

BELO HORIZONTE – MG

FACULDADE DE FARMÁCIA – UFMG

2012

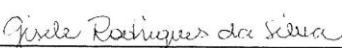
FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELLA MARIA FERNANDES CUNHA

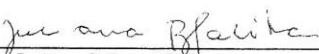
"Determinação do perfil de eliminação dos fármacos triancinolona acetonida e acetato de dexametasona em olhos vitrectomizados"


Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em quatro de abril de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA


 Profa. Dra. Gisela Rodrigues da Silva - UFSJ


 Dra. Isabela da Costa César - UFMG


 Dra. Juliana Barbosa Saliba - UFMG


 Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior - UFMG

“Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo.”

(Vinícius de Moraes)

*Dedico este trabalho à
minha mãe Eunice, que
me propiciou uma vida
digna onde eu pudesse
crescer, acreditando que
tudo é possível, desde
que sejamos honestos,
íntegro de caráter e
tendo a convicção de
que sonhar e concretizar
os sonhos só depende da
nossa vontade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas constantes oportunidades que vem proporcionando em minha vida, pelo Seu apoio e amor que se faz presente em todos os momentos.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior, pela confiança e pelos aprendizados. É um grande ser humano e um grande amigo com quem posso contar.

À Doutora Juliana Barbosa Saliba, pelo constante apoio e pelas idéias que foram fundamentais na execução deste trabalho. Agradeço também pela sua amizade, carinho e seu positivismo.

Ao professor Doutor Rubens Camargo Siqueira pela sua grande contribuição a este trabalho.

À minha querida mãe Eunice, por ser a verdadeira mestre em minha vida, pelos seus ensinamentos valiosos, pelo seu caráter e luta que são responsáveis por eu ser quem sou.

Ao Matheus de Bastos, por ser o meu melhor amigo, pelos finais de semana no laboratório, por enxugar as minhas lágrimas quando era necessário e pelos momentos felizes.

Ao meu primo e professor Doutor Alexandre César Cunha Leite, por ser uma grande inspiração e por mostrar que tudo é possível se lutarmos por aquilo queremos. E a sua família, essenciais em minha vida.

Aos meus primos André e Deborah, pelas noites na faculdade de farmácia, por serem meus melhores amigos e pessoas em quem posso confiar.

Às minhas tias Lea, Dea e Andréia, à minha ávo Maria, à Rosangela, ao Sílvio e Thiago por mostrarem que família é o bem mais precioso que temos.

À Arianne de Assis Alves, pela sua alegria que contagia, pelo incentivo, pela ajuda, amizade e companheirismo que se tornaram peças fundamentais nessa caminhada.

À Marcela Morais, por ser uma pessoa em quem posso confiar, pelo seu entusiasmo com a pesquisa, pela sua simplicidade e sinceridade.

À Camila Filizzola, pela sua amizade e companheirismo, pelas horas descontraídas nos cafés, por ser uma pessoa que está sempre disposta a ajudar e a escutar.

Ao Ricardo, Lorena, Betânia, Ana Barbara, Lili, Leilinha, Sávia e Juçara pela grande ajuda que deram a este trabalho, no manuseio do HPLC e nas análises estatísticas.

Às queridas amigas do laboratório Lorena, Lili, Leilinha, Livinha, Dani e Júlia e aos amigos Samuel e Elton pelas palavras de carinho, pelas descontrações e amizade.

Às minhas amigas Chris, Camila, Lídia, Bárbara Coelho, Isa, Bruna Cláudia e Carlinha por fazerem parte dessa caminhada desde o jardim de infância até os dias de hoje.

À Gabriela de Aquino pela amizade, presença e companheirismo.

À Karol pela amizade, pelos conselhos e pela sua positividade

Às amigas de Faculdade, Gabriela de Oliveira, Juliana, Émilie, Sarah, Denise e em especial à Brenda, pelas conversas durante os almoços, pelas risadas e momentos de descontração.

Ao pessoal do laboratório de tecnologia farmacêutica; Sávia, Brunão, Guilherme, Talita e Diego pela boa convivência.

RESUMO

A retinopatia diabética proliferativa está entre as principais causas de cegueira irreversível no mundo inteiro. Na doença, os novos vasos formados são mais susceptíveis à ruptura, levando ao extravasamento de sangue no humor vítreo e ao crescimento de tecido fibroso, o que pode causar descolamento da retina por tração. A vitrectomia *pars plana* é um procedimento cirúrgico realizado para tratar as complicações da retinopatia diabética proliferativa. Nesta cirurgia, muitas vezes o humor vítreo é substituído pelo óleo de silicone (SO, do inglês - *Silicone Oil*). As causas mais comuns do insucesso da cirurgia são a reproliferação de tecido fibroso, a hemorragia vítrea recorrente e os problemas relacionados com o SO. Os esteróides, como por exemplo, a triancinolona acetona (TA, do inglês - *Triamcinolone acetonide*) vêm sendo usados, por meio de injeções intravítreas para tratar doenças oculares, uma vez que apresentam efeitos antiinflamatórios e antiangiogênicos. Para manter a concentração de fármacos na faixa terapêutica são necessárias injeções repetidas que podem causar vários danos. Como alternativa aos inconvenientes das injeções intraoculares, sistemas de liberação prolongada (implantes) constituídos de polímeros biodegradáveis, estão sendo estudados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil de eliminação e a neuroproteção dos fármacos, TA e acetato de dexametasona (DA, do inglês - *Dexamethasone acetate*), administrados por meio de injeções intravítreas e por meio de implantes, respectivamente, e a partir disso avaliar a utilização dos implantes de DA como uma alternativa clínica para o tratamento das complicações relacionadas ao uso do SO em cirurgia de vitrectomia. A concentração dos fármacos foi determinada por meio de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) a partir da extração destes do SO. Os resultados encontrados mostraram que o fármaco TA permaneceu na cavidade vítrea por cinco semanas e o fármaco DA não mais que quatro semanas de estudo. Ambos os fármacos administrados a partir de diferentes formulações apresentaram efeito neuroprotetor da retina. No entanto, como a eliminação dos fármacos foi aumentada, conclui-se que é necessário usar uma maior concentração bem como estudar outros tipos de polímero, para se preparar implantes diferenciados para o uso em olhos vitrectomizados.

Palavras chaves: Óleo de silicone, vitrectomia, triancinolona acetona, acetato de dexametasona, implante PLGA, injeção intravítrea

ABSTRACT

Proliferative diabetic retinopathy is one of the leading causes of irreversible blindness around the world. In this disease, the newly-formed vessels are more susceptible to break, resulting in blood extravasation in the vitreous humor and the growth of fibrous tissue, which can cause retinal detachment by traction. The *pars plana* vitrectomy is a surgical procedure to treat proliferative diabetic retinopathy complications. In this surgery, the vitreous humor is often replaced by SO (*Silicone Oil*). The most common causes of surgical failure are fibrous tissue re proliferation, recurrent vitreous hemorrhage and problems related to the SO. Steroids, such as TA (*Triamcinolone acetonide*) have been used by intravitreal injection to treat eye diseases because of its anti-inflammatory and anti-angiogenic effects. To maintain the TA concentration within the therapeutic range repeated injections are necessary, but they may cause various damages. As an alternative to the inconvenience of intraocular injections, extended-delivery systems (implants) made of biodegradable polymers are being studied. Therefore, the present work studied the elimination profile and neuroprotection of the drugs, TA and DA (*Dexamethasone acetate*), administered by intravitreal injections and through implants, respectively, and from that evaluate the use of implants as a clinical alternative for the treatment of complications related to the use of SO in vitrectomy surgery. The concentration of drugs was determined by HPLC (*high performance liquid chromatograph*) by extracting them from the SO. The results showed that the drug TA remained inside the vitreous cavity for five weeks and the DA drug remained no longer than the fourth week of study. Both drugs administered from different formulations presented a neuroprotective effect in the retina. However, due to increased elimination of these drugs, it is concluded the necessity of using a higher concentration as well as studying other types of polymer to prepare different implants for use in vitrectomized eyes.

Keywords: silicone oil, vitrectomy, triamcinolone acetonide, dexamethasone acetate, PLGA implant, intravitreal injection

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURAS QUE COMPÕEM O BULBO DO OLHO.....	4
FIGURA 2 -	ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA RETINA.....	6
FIGURA 3 -	CIRURGIA DE VITRECTOMIA <i>PARS PLANA</i>	12
FIGURA 4 -	ESTRUTURA DO ÓLEO DE SILICONE.....	14
FIGURA 5 -	ESTRUTURA DA TA.....	19
FIGURA 6 -	INJEÇÃO DE TA DURANTE CIRURGIA DE VITRECTOMIA.....	20
FIGURA 7 -	INJEÇÃO INTRAVÍTREA DE TA.....	22
FIGURA 8 -	ESTRUTURA DO FÁRMACO.....	23
FIGURA 9 -	ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE DISPERSÃO DOS FÁRMACOS DA E TA NO SO PARA POSTERIOR EXTRAÇÃO.....	40
FIGURA 10 -	ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS FÁRMACOS DA E TA EM SO.....	41
FIGURA 11 -	ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS FÁRMACOS DA E TA EM SO COM DIFERENTES QUANTIDADES DE SOLVENTE.....	42
FIGURA 12 -	ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS FÁRMACOS DA E TA EM SO COM DIFERENTES TEMPOS DE AGITAÇÃO.....	43
FIGURA 13 -	PREPARO DOS IMPLANTES DE PLGA E DA.....	44
FIGURA 14 -	TROCATER TRANSCLERAL (ACCURUS [®] 25 – GAUGE SYSTEM, ALCON, INC, EUA) UTILIZADO NA PADRONIZAÇÃO DA ESPESSURA DOS IMPLANTES.....	45
FIGURA 15 -	IMPLANTES DE PLGA CONTENDO O FÁRMACO DA.....	45
FIGURA 16 -	ESQUEMA DO ESTUDO <i>IN VIVO</i> DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À VITRECTOMIA E DOSAGEM POR CLAE.....	46
FIGURA 17 -	APARELHO DE VITRECTOMIA DE ALTA VELOCIDADE (HARMONY TOTAL, DORC, NETHERLANDS).....	47
FIGURA 18 -	ESQUEMA DO ESTUDO <i>IN VIVO</i> DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À VITRECTOMIA E AO ESTUDO HISTOLÓGICO.....	49
FIGURA 19 -	ESPECTRO DE VARREDURA DO FÁRMACO TA (1). ESPECTRO DE VARREDURA DO FÁRMACO DA (2).....	53
FIGURA 20 -	CROMATOGRAMA DO HUMOR AQUOSO DO GRUPO CONTROLE (1). CROMATOGRAMA DA FORMULAÇÃO DA SUSPENSÃO INJETÁVEL DO FÁRMACO TA (2). CROMATOGRAMA DO PADRÃO DO FÁRMACO TA COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 12,3 MINUTOS (3). CROMATOGRAMA DA EXTRAÇÃO DO SO DO GRUPO CONTROLE (SO SEM O FÁRMACO) (4).....	54
FIGURA 21 -	CROMATOGRAMA DO HUMOR AQUOSO DO GRUPO CONTROLE (1). CROMATOGRAMA DO PADRÃO DO FÁRMACO DA COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 3,7 MINUTOS (2). CROMATOGRAMA DA EXTRAÇÃO DO SO DO GRUPO CONTROLE (SO SEM O FÁRMACO) (3). CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO PLGA (4).....	55
FIGURA 22 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O FÁRMACO DA NA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE.....	57
FIGURA 23 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O FÁRMACO TA NA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE.....	58
FIGURA 24 -	CROMATOGRAMA DO HUMOR AQUOSO DO GRUPO CONTROLE (AMARELO). CROMATOGRAMA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO PLGA (AZUL). CROMATOGRAMA DA EXTRAÇÃO DO SO DO GRUPO CONTROLE (SO SEM O FÁRMACO) (VERDE). CROMATOGRAMA DO PADRÃO DO FÁRMACO DA (VERMELHO).....	62
FIGURA 25 -	CROMATOGRAMA DO HUMOR AQUOSO DO GRUPO CONTROLE (AMARELO). CROMATOGRAMA DA FORMULAÇÃO DA SUSPENSÃO INJETÁVEL DO FÁRMACO TA (AZUL). CROMATOGRAMA DA EXTRAÇÃO DO SO DO GRUPO CONTROLE (SO SEM O FÁRMACO). CROMATOGRAMA DO PADRÃO DO FÁRMACO TA (VERMELHO).....	63
FIGURA 26 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO DA EM SO COM OS SOLVENTES ACETONITRILA, METANOL E ÁGUA. DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA EXTRAÇÃO) * P < 0,0001 (TESTE DE <i>TUKEY'S</i>).....	67
FIGURA 27 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO TA EM SO COM OS SOLVENTES ACETONITRILA, METANOL E ÁGUA. DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA EXTRAÇÃO) * P < 0,0001 (TESTE DE <i>TUKEY'S</i>).....	67

FIGURA 28 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO DA COM 1 ML E COM DUAS PORÇÕES DE 500 µL DO SOLVENTE ACETONITRILA. DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA EXTRAÇÃO) *P < 0,05 (TESTE <i>T STUDENT</i>).....	69
FIGURA 29 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO TA COM 1 ML E COM DUAS PORÇÕES DE 500 µL DO SOLVENTE ACETONITRILA. DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA EXTRAÇÃO) *P < 0,05 (TESTE <i>T STUDENT</i>).....	69
FIGURA 30 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO DA NO TEMPO DE 5, 10 E 15 MINUTOS. DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA EXTRAÇÃO) P > 0,05 (TESTE DE <i>TUKEY'S</i>).....	70
FIGURA 31 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO TA NO TEMPO DE 5, 10 E 15 MINUTOS. DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA EXTRAÇÃO) P > 0,05 (TESTE DE <i>TUKEY'S</i>).....	70
FIGURA 32 -	CONCENTRAÇÃO DO FÁRMACO TA EM µG/100 µL APÓS SEMANAS 1 E 5 PRESENTES NO SO. DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA SEMANA).....	72
FIGURA 33 -	CONCENTRAÇÃO DO FÁRMACO TA EM µG/100 µL APÓS SEMANAS 1 E 5 PRESENTES NI HUMOR AQUOSO (HA). DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=3 PARA CADA SEMANA).....	74
FIGURA 34 -	ELIMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DO FÁRMACO TA NA CAVIDADE VÍTREA.....	75
FIGURA 35 -	ESQUEMA DA DEGRADAÇÃO DO IMPLANTE.....	77
FIGURA 36 -	DENSIDADE DE CÉLULAS DOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDADOS: CAMADA NUCLEAR EXTERNA DA RETINA (A), CAMADA NUCLEAR INTERNA DA RETINA (B), CAMADA DE CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA (C). DADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. *P < 0,05 (TESTE DE <i>TUKEY'S</i>).....	79

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 -	PROGRAMAÇÃO DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA COM O MODO DO FLUXO GRADIENTE.....	34
TABELA 2 -	DILUIÇÕES PARA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO DA.....	36
TABELA 3 -	DILUIÇÕES PARA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO TA.....	37
TABELA 4 -	VARIAÇÃO DA FASE MÓVEL EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	53
TABELA 5 -	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA O FÁRMACO DA NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	54
TABELA 6 -	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA O FÁRMACO TA NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	56
TABELA 7 -	DADOS DA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO FÁRMACO DA.....	56
TABELA 8 -	RESULTADOS DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A REGRESSÃO LINEAR DO FÁRMACO DA.....	57
TABELA 9 -	DADOS DA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO FÁRMACO TA.....	58
TABELA 10 -	RESULTADOS DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A REGRESSÃO LINEAR DO FÁRMACO TA.....	59
TABELA 11 -	VALORES DE DESVIO PADRÃO RELATIVO DA AVALIAÇÃO DA REPETIBILIDADE E DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSAGEM DO FÁRMACO DA.....	60
TABELA 12 -	VALORES DE DESVIO PADRÃO RELATIVO DA AVALIAÇÃO DA REPETIBILIDADE E DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DOSAGEM DO FÁRMACO TA.....	60
TABELA 13 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DA DA ADICIONADA AO SO PARA A AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO.....	61
TABELA 14 -	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DA TA ADICIONADA AO SO PARA A AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO.....	61
TABELA 15 -	PORCENTAGEM DA RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO DA EM SO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO E DPR DAS EXTRAÇÕES COM OS SOLVENTES ACETONITRILA, METANOL E ÁGUA.....	66
TABELA 16 -	PORCENTAGEM DA RECUPERAÇÃO DO FÁRMACO TA EM SO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO E DPR DAS EXTRAÇÕES COM OS SOLVENTES ACETONITRILA, METANOL E ÁGUA.....	67

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1 -	INDICAÇÕES DA CIRURGIA DE VITRECTOMIA DEVIDO A COMPLICAÇÕES DA RETINOPATIA DIABÉTICA.....	13
QUADRO 2 -	ANIMAIS DOS GRUPOS 1, 2, 3 SACRIFICADOS APÓS AS SEGUINTE SEMANAS (N=3).....	48
QUADRO 3 -	DADOS DA VALIDAÇÃO OBTIDOS PARA O FÁRMACO DA.....	65
QUADRO 4 -	DADOS DA VALIDAÇÃO OBTIDOS PARA O FÁRMACO TA.....	65
QUADRO 5 -	TEMPO DE PERMANENCIA DO FÁRMACO TA NO HUMOR VÍTREO OU NO HUMOR AQUOSO POR DIFERENTES AUTORES.....	71

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACN	Acetonitrila
ATP	Trifosfato de adenosina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais em Laboratório
CCG	Camada de células ganglionares
cSt	Centistokes
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
DA	Do inglês - <i>Dexametashone acetate</i>
DM	Diabetes melittus
DMRA	Degeneração macular relacionada à idade
DPR	Desvio padrão relativo
DP	Desvio padrão
EPR	Epitélio pigmentar da retina
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês - <i>Food and Drug Administration</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
H ₂ O	Água
HA	Humor aquoso
MeOH	Metanol
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NEI	Do inglês – <i>Nacional Eye Institute</i>
PLA	Poli (DL-lático)
PGA	Poly(glycolic acid)
PLGA	Poly (lactide-co-glycolide)

RD	Retinopatia diabética
RP	Ribeirão Preto
RPM	Rotação por minuto
SEM	Desvio Padrão da Média
SO	Do inglês - <i>Silicone Oil</i>
TA	Do inglês - <i>Triamcinolone acetonide</i>
TSV	Do inglês - Transconjunctival Sutureless Vitrectomy
UV	Ultravioleta
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VRP	Vitreorretinopatia proliferativa

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 O bulbo do olho.....	4
2.1.1 Segmento anterior do bulbo do olho.....	4
2.1.2 Segmento posterior do bulbo do olho.....	5
2.2 A retinopatia diabética.....	7
2.2.1 Aspectos gerais da doença.....	7
2.2.2 Tratamentos da retinopatia diabética.....	8
2.3 Neuroproteção.....	16
2.4 Antiinflamatórios esteróides intraoculares.....	18
2.4.1 Triancinolona acetonida.....	19
2.4.2 Acetato de dexametasona.....	23
2.5 Obstáculos à farmacoterapia do segmento posterior.....	27
3 JUSTIFICATIVA.....	29
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo geral.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5 PARTE EXPERIMENTAL.....	32
5.1 Material.....	32
5.2 Métodos.....	33
5.2.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de análise dos fármacos acetato de dexametasona (DA) e triancinolona acetonida (TA) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	33
5.2.2 Desenvolvimento do método de extração dos fármacos DA e TA em SO.....	39
5.2.3 Preparo dos implantes intraoculares de DA.....	43
5.2.4 Vitrectomia <i>Pars Plana</i>	45

5.2.5 Estudo histológico.....	48
5.2.6 Determinação da quantidade dos fármacos presentes no SO a partir da injeção intravítrea de TA e de implantes de DA	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de análise dos fármacos DA e TA.....	52
6.1.1 Desenvolvimento dos métodos analíticos.....	52
6.1.2 Validação dos métodos analíticos.....	56
6.2 Desenvolvimento do método de extração dos fármacos DA e TA em SO.....	65
6.2.1 Dispersão dos fármacos DA e TA em SO.....	65
6.2.2 Seleção do solvente para extração dos fármacos.....	66
6.2.3 Seleção da quantidade de solvente e do tempo ideal para extração dos fármacos DA e TA.....	68
6.3 Determinação da quantidade do fármaco TA presente no SO e no humor aquoso a partir da injeção intravítrea.....	71
6.4 Determinação da quantidade do fármaco DA presente no SO e no humor aquoso a partir do implante de PLGA.....	76
6.5 Estudo histológico.....	78
7 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

As doenças do segmento posterior do bulbo do olho são responsáveis pela maioria dos casos de cegueira irreversível no mundo inteiro. Dentre estas doenças se destaca a retinopatia diabética que atinge grande parte da população mundial que apresenta diabetes. Cerca de 90% de todos os diabéticos apresentam algum tipo de retinopatia após os 20 anos da ocorrência da doença (Fialho, 2006).

A patogênese da doença é considerada complexa e multifatorial. Ocorrem microaneurismas, aumento da permeabilidade da barreira hematorretiniana e neovascularização. A retinopatia diabética é clinicamente dividida em dois estágios, a fase não proliferativa e a fase proliferativa. A fase não proliferativa é caracterizada por alterações intra-retinianas associadas ao aumento da permeabilidade capilar e à oclusão vascular. Esta pode progredir para o estágio mais grave que é a fase proliferativa. Este estágio é caracterizado pela formação de novos vasos na retina que crescem em direção à interface vítrea, podendo evoluir para a perda irreversível da acuidade visual, principalmente pelo descolamento tracional da retina (Alder et al., 1997; Bosco et al., 2005).

A vitrectomia *pars plana* é um procedimento cirúrgico realizado no tratamento de hemorragia vítrea e descolamento da retina, principais complicações da retinopatia diabética proliferativa. É uma cirurgia que tem como objetivo remover a hemorragia vítrea e o tecido fibroso, o que evita o descolamento da retina. O humor vítreo pode ser substituído por óleo de silicone ou por gases como o hexafluoreto de silício e perfluopropano. O óleo de silicone é preferido, uma vez que facilita a “colagem” da retina por fornecer um tamponamento intraocular prolongado (Castellarin, et al., 2003).

No entanto, são relatados problemas relacionados com o óleo de silicone e com a cirurgia de vitrectomia, dentre eles, podemos citar a morte das células das camadas da retina, hemorragias vítreas recorrentes e reproliferação de células.

Estudos vêm demonstrando que estas complicações podem ser controladas com o uso de esteróides. Triancinolona acetonida e acetato de dexametasona são antiinflamatórios esteróides usados com frequência no tratamento de doenças oculares. Os esteróides possuem propriedades antiangiogênicas, antiinflamatórias e antipermeáveis. A ação antiangiogênica está relacionada com a supressão da expressão do fator de crescimento de endotélio vascular, enquanto que a ação antipermeável está relacionada com a proteção da barreira hematorretiniana, o que evita sua quebra e diminui a permeabilidade vascular (Serrarbassa et al., 2008). Assim, esses fármacos controlam a inflamação intraocular e diminuem a proliferação de células inflamatórias. Também foi relatado o efeito neuroprotetor dos esteróides, uma vez que, a função visual comprometida após lesão traumática do nervo óptico, pode ser melhorada com a utilização de dexametasona e metilprednisolona (Chan et al., 1996).

Os fármacos têm sido administrados no bulbo do olho pela via tópica, na forma de soluções, suspensões, géis e pomadas. No entanto, esta forma de administração apresenta um efeito terapêutico praticamente insignificante nas estruturas posteriores do olho. Os fármacos utilizados pela via sistêmica também penetram muito pouco no olho e, algumas vezes, é necessário o tratamento prolongado com doses elevadas, por meio de injeções intravenosas, para manutenção da concentração do fármaco no vítreo dentro da faixa terapêutica, o que pode ocasionar sérios efeitos adversos. Assim, a via intraocular tem sido a de escolha para o tratamento de diferentes doenças que acometem o segmento posterior do olho. Entretanto, os fármacos administrados por essa via possuem um rápido perfil de eliminação e assim, para que se obtenha uma terapia eficaz, são necessárias múltiplas injeções intraoculares de forma a manter a concentração do princípio ativo dentro da faixa terapêutica, no local onde se desenvolve a doença e durante um período prolongado. Porém, injeções intraoculares repetidas podem causar hemorragia vítrea, descolamento da retina, endoftalmite e catarata. A principal alternativa para as injeções intravítreas em avaliação atualmente consiste no emprego de sistemas de liberação biodegradáveis de administração intraocular (implantes) que promovem uma liberação prolongada do fármaco diretamente no humor vítreo assegurando concentrações terapêuticas por um longo período, além

de evitarem complicações relacionadas com as injeções intravítreas (Felt-Baeyens et al., 2006).

O presente trabalho objetivou determinar o perfil de eliminação do fármaco acetato de dexametasona, administrado por meio de implantes e do fármaco triancinolona acetonida, administrado por meio de injeções intravítreas em olhos vitrectomizados.

O trabalho também avaliou o efeito neuroprotetor dos fármacos acetato de dexametasona e triancinolona acetonida. A avaliação da neuroproteção das células da retina é de grande importância após cirurgia de vitrectomia uma vez que o óleo de silicone pode causar a morte celular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O bulbo do olho

O bulbo do olho é formado pelo segmento anterior o qual é constituído pela conjuntiva, íris, cristalino, pupila, córnea, humor aquoso e esclera e pelo segmento posterior, que compreende o humor vítreo, a retina, coróide, o nervo óptico e também a esclera. A Figura 1 representa as estruturas que compõem o olho (Lloyd et al., 2001).

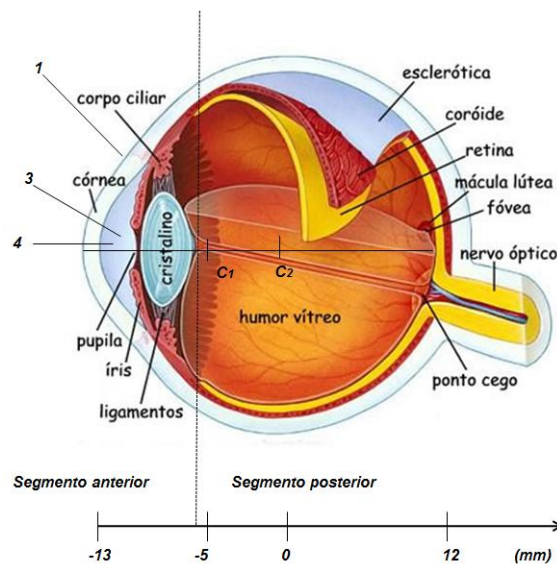


Figura 1 - Estruturas que compõem o bulbo do olho (Fonte: adaptado de Saliba, 2011).

2.1.1 Segmento anterior do bulbo do olho

A córnea é um tecido transparente e não vascularizado com diâmetro e espessura média de 12 mm e 250 μm , respectivamente. É uma estrutura composta por três camadas avasculares compreendendo o epitélio exterior, o estroma interno e a camada interna endotelial. A camada endotelial é separada do estroma pela membrana de Descemet. A córnea é altamente sensível a agressões físicas

externas e pode ser danificada mesmo quando exposta a leves contatos (Lloyd et al., 2001).

O humor aquoso é um líquido aquoso e transparente, constantemente renovado, preenche a câmara anterior e é formado pelo espaço entre a córnea e a lente. Ele é secretado pelos constituintes do corpo ciliar na câmara posterior, migra para a câmara anterior ao passar pela pupila e é drenado às veias venosas da circulação sistêmica via canal de Schlemm. Como resultado deste processo, o bulbo do olho possui uma pressão intraocular mensurável, que é largamente dependente do equilíbrio entre a taxa de produção de humor aquoso, a força motriz da sua geração e da taxa de drenagem através da rede trabecular (Lloyd et al., 2001).

2.1.2 Segmento posterior do bulbo do olho

A esclera é uma camada externa protetora que cobre o olho. É densa, branca, continua com a córnea anteriormente e com a bainha do nervo óptico posteriormente. Está presente tanto no segmento posterior do olho quanto no anterior (Oréfice, 2005).

A coróide é uma estrutura fina, pigmentada e extremamente vascularizada, forrando a superfície interna da esclera. A superfície interna, lisa, é firmemente aderida ao estrato pigmentoso da retina. A superfície externa, áspera, é firmemente aderida à esclera. A principal função da coróide é o suprimento sanguíneo das camadas externas da retina (Oréfice, 2005).

O humor vítreo é constituído de água, colágeno, proteínas do plasma e ácido hialurônico. Está em direto contato com a retina, com o corpo ciliar e com 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 (Oréfice, 2005).

A retina (Figura 2) 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, que são compostos pelos cones e bastonetes (Lloyd et al., 2001). A superfície externa da retina sensorial é oposta ao epitélio pigmentado retiniano e, portanto, relaciona-se com a membrana de Bruch, a coróide e a esclerótica. Na maioria das áreas, a camada neurosensorial e o epitélio pigmentar da retina (EPR) são facilmente separados para formar um espaço subretiniano, que ocorre no descolamento da retina. As camadas da retina, começando pelo lado interno, são as seguintes: membrana limitante interna; camada de fibras nervosas, contendo axônio das células ganglionares passando para o nervo óptico; camada de células ganglionares; camada plexiforme interna, contendo as conexões das células ganglionares com as células bipolares e amácrinas; camada nuclear interna dos corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas; camada plexiforme externa, contendo sinapses das células bipolares e horizontal com os fotorreceptores; camada nuclear externa dos núcleos dos fotorreceptores; membrana limitante externa; camada de fotorreceptores: bastonetes e cone; epitélio pigmentar da retina (Oréfice, 2005).

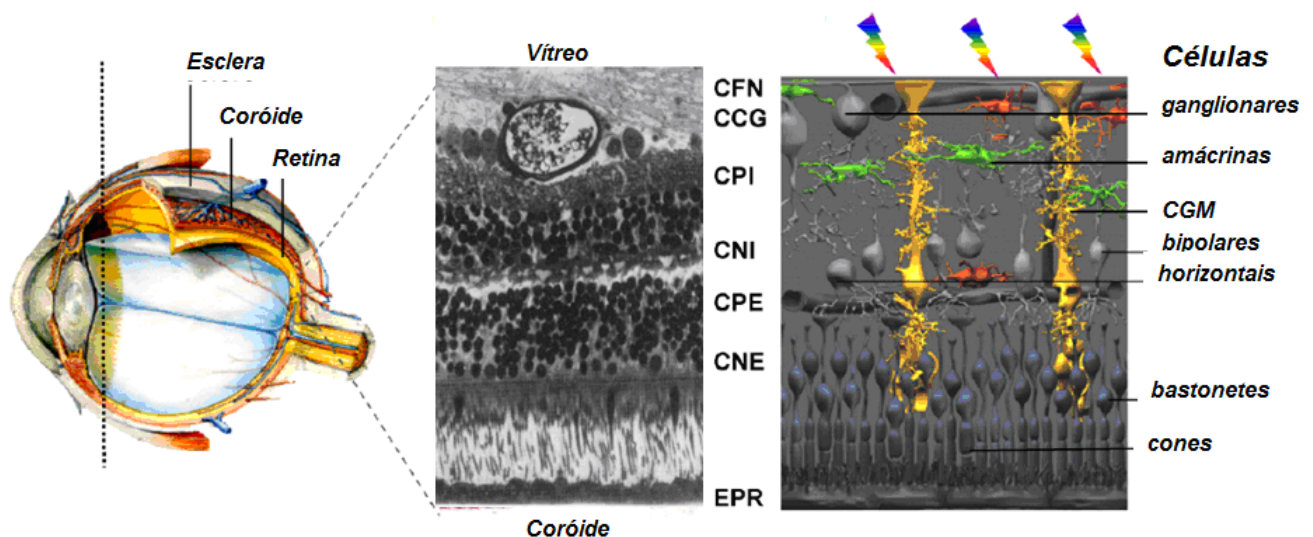


Figura 2 - Estrutura e organização da retina. CFN: Camada de Fibras Nervosas, CCG: Camada de Células Ganglionares, CPI: Camada Plexiforme Interna, CNI: Camada Nuclear Interna, CPE: Camada Plexiforme Externa, CNE: Camada Nuclear Externa, EPR: Epitélio Pigmentar da Retina (Fonte: Imagens cedidas por F. Behar. Cohen apud Saliba, 2011¹).

¹ Imagens cedidas pela Prof. Dra. Francine Behar-Cohen em seminário na Unidade 17 do INSERM UMRS 872, Paris, 10 maio 2010.

2.2 A retinopatia diabética

2.2.1 Aspectos gerais da doença

O diabetes *mellitus* (DM) faz parte de um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de distúrbios na secreção de insulina e/ou na ação da insulina. A hiperglicemia associa-se a complicações em diversos órgãos, dentre eles os olhos (Mendonça et al., 2008).

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação muito comum do diabetes e é uma grande causa de cegueira no mundo, a qual é decorrente da alteração dos vasos retinianos sendo o principal fator de cegueira na faixa etária dos 20 aos 50 anos. A prevalência da RD aumenta com a duração da doença e com a idade do paciente. Após 20 anos de doença, perto de 99 % dos portadores de DM insulino dependentes e 60 % dos portadores de DM não insulino dependentes apresentam algum grau de RD (Mendonça et al., 2008).

A RD é clinicamente dividida em dois estágios principais, RD não proliferativa e RD proliferativa. Na fase não proliferativa ocorre microaneurismas, edema macular e extravasamento de lipoproteínas, devido ao aumento da permeabilidade vascular que é conseqüência da quebra da barreira hematorretiniana. A progressão da RD não proliferativa está associada à presença de extensas áreas de isquemia capilar caracterizadas por hemorragia na superfície da retina e pelas anormalidades microvasculares intra-retinianas. Em resposta a essa intensa isquemia, ocorre a liberação de substâncias vasoativas, principalmente de dos fatores de crescimento que estimulam o surgimento dos neovasos, o que caracteriza a fase proliferativa. As causas mais freqüentes da perda da visão ocorrem na fase proliferativa da doença. (Bosco et al., 2005; Damico, 2007). Os novos vasos possuem paredes mais finas que os vasos normais o que os torna mais suscetíveis à ruptura. Essa ruptura dos vasos resulta no extravasamento de sangue para o humor vítreo, o que pode evoluir para a perda irreversível da acuidade visual em decorrência da hemorragia vítrea e do descolamento tracional da retina. O descolamento tracional da retina ocorre em

consequência do crescimento de tecido fibroso durante a cicatrização da hemorragia. Essa cicatriz fibrosa pode se contrair, causando assim o descolamento da retina por tração (Bresnick e Myers, 1979; Bosco et al., 2005).

2.2.2 Tratamentos da retinopatia diabética

2.2.2.1 Fotocoagulação

O procedimento de fotocoagulação consiste na coagulação das células da retina com um raio laser de comprimento de onda que pode variar entre 510-810 nm. As células primariamente atingidas pelo laser são as do EPR e os melanócitos coroidais. Dessa forma, as células isquêmicas da retina são destruídas, o que promove uma melhor oxigenação do tecido diminuindo o estímulo para a produção de fatores angiogênicos. Segundo o *National Eye Institute* (NEI), existem três indicações para intervenção com a fotocoagulação as quais são hemorragia vítrea, neovascularização atingindo um terço ou mais do disco óptico e edema macular (Bosco et al., 2005). Um estudo sobre o efeito da fotocoagulação em pacientes com RD demonstrou uma redução de 15,9 % para 6,4 % na taxa de perda da visão entre os pacientes tratados (Mello Filho et al., 2010). Os efeitos colaterais decorrentes da fotocoagulação consistem em dificuldade para leitura, aceleração da catarata e diminuição do campo visual (Bosco et al., 2005).

2.2.2.2 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é um procedimento recente que consiste na interação de luz de comprimento de onda adequado (693 nm) com um composto não tóxico, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio capazes de inviabilizar as células (Machado, 2006). As células inviabilizadas são preferencialmente as que se reproduzem rapidamente uma vez que o composto fotossensível se acumula nestas

células (Simplício et al., 2002). Devido a este princípio, a terapia fotodinâmica vem sendo usada em doenças intraoculares que apresentam a neovascularização como característica principal, como é o caso da retinopatia diabética proliferativa. Shah e colaboradores em 2011 mostraram que a terapia fotodinâmica pode ser benéfica no tratamento da coriorretinopatia serosa central, da coróide idiopática polipoidal e da degeneração macular relacionada a idade (DMRA), esta quando associado com agentes inibidores do fator endotelial de crescimento vascular. O medicamento fotossensível aprovado para o uso em pacientes que apresentam neovascularização devido à degeneração macular relacionada com a idade é o verteporfin (Visudyne®). O Verteporfin é um potente agente fotossensível derivado do porphyrin, é uma substância quimicamente estável e tem se mostrado eficiente em gerar espécies de oxigênio. O Visudyne® é uma formulação lipossômica, apresentada na forma de um pó liofilizado o qual é reconstituído em água antes de ser utilizado. Este medicamento é administrado pela via endovenosa 15 minutos antes do tratamento por raio laser. Este é projetado diretamente sobre a região da retina que se pretende tratar (Weinreb e Cotlier, 2000). O resultado deste procedimento é a produção local de espécies reativas as quais provocam a oclusão vascular por meio de uma cascata complexa de eventos celulares. Richter e colaboradores em 1987 compararam o verteporfin com outro agente fotossensível, o hematoporphyrin. Os autores reportaram que o verteporfin foi cerca de quatro vezes mais eficiente em absorver comprimentos de onda de aproximadamente 700 nm, os quais penetram melhor no tecido e forneceu um maior efeito citotóxico quando comparado com o hematoporphyrin. Uma das principais vantagens do verteporfin é a sua rápida eliminação do organismo. Em camundongos, o verteporfin alcança após três horas, um nível máximo nos tecidos, seguida de uma rápida eliminação. Semelhantemente, o verteporfin foi completamente eliminado do tecido corneal neovascularizado e do tecido corneal normal, após 48 horas. Estudos em vários modelos animais mostraram que a meia-vida do verteporfin é de aproximadamente 2-5 horas após uma injeção endovenosa. No entanto, a terapia pode afetar vasos saudáveis o que pode levar a recorrência da doença intraocular (Bradley, et al., 2007).

2.2.2.3 Agentes inibidores do fator endotelial de crescimento vascular

O fator endotelial de crescimento vascular (VEGF) é um fator presente em grandes quantidades no humor aquoso e no humor vítreo de pacientes com RD proliferativa. Este aumenta a permeabilidade vascular das células da retina causando o edema retiniano e leva a formação de novos vasos. Entre os agentes anti-VEGF disponíveis estão o bevacizumabe, o pegaptanibe, o ranibizumabe e o aflibercept.

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado ativo contra todas as isoformas do VEGF-A. Foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento sistêmico de câncer colorretal metastatizado. Apesar de seu uso *off-label*, o bevacizumabe demonstrou eficácia no tratamento de edema macular, neovascularização da íris e alguns estudos demonstraram sua eficácia contra várias complicações da RD proliferativa. O ranibizumabe é um fragmento de anticorpo monoclonal humanizado, também ativo contra todas as isoformas do VEGF-A. Ranibizumabe intravítrea foi aprovado pelo FDA para tratar degeneração macular relacionado com a idade (Schwartz e Flynn, 2007; Gomes, 2011). O pegaptanib (Macugen®) foi aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de neovascularização intraocular causada pela DMRA. O fármaco foi desenvolvido para bloquear a atividade do VEGF extracelular (Zampros et al., 2012). Christoforidis e colaboradores, em 2012, reportaram que o pegaptanibe intravítreo se mostrou eficaz em suprimir a neovascularização durante a cicatrização de feridas cutâneas em modelo de coelho, uma semana após o tratamento. Em 2011, o FDA aprovou o uso do fármaco aflibercept (Eylea®) para ser usado no tratamento da neovascularização provocada pela DMRA. Este fármaco é uma proteína que foi desenvolvido para se ligar ao fator A do VEGF (Ratner, 2012).

No tratamento da RD, estes fármacos são aplicados dentro da cavidade vítrea. Em decorrência da curta duração do seu efeito, os anti-VEGFs necessitam de injeções intravítreas repetidas, o que aumenta o risco de endoftalmite, de aumento da pressão intraocular, de lesão de epitélio pigmentar, lesão e descolamento de retina (Valiatti et al., 2011).

2.2.2.4 Esteróides

Os esteróides agem por diversos mecanismos de ação e podem ser administrados tanto pela via sistêmica como pela via intraocular. Além de seus efeitos antiinflamatórios, estes também diminuem a produção de VEGF. Um estudo randomizado demonstrou que a triancinolona acetonida em doses entre 1-4 mg quando usada como adjuvante na fotocoagulação na RD, diminui o edema macular, que muitas vezes é piorado pelo tratamento com o laser. Outros antiinflamatórios esteróides que estão sendo usados no tratamento da RD proliferativa são a fluocinolona acetonida e a dexametasona (Schwartz e Flynn, 2007).

2.2.2.5 Vitrectomia pars plana

Historicamente a primeira indicação da cirurgia de vitrectomia foi hemorragia vítrea diabética (Aaberg e Abrams, 1987).

A vitrectomia *pars plana* (Figura 3) é um procedimento cirúrgico caracterizado pela remoção do humor vítreo através da *pars plana*, sendo realizada para inúmeras doenças oculares, incluindo a RD proliferativa. De acordo com o estudo realizado sobre os tratamentos da RD, pelo menos 5 % dos olhos recebendo tratamento clínico ainda terão RD progressiva, os quais poderão, em determinado estágio da doença, ser tratados com vitrectomia (Smiddy e Flynn, 1999).

Neste procedimento o humor vítreo pode ser substituído por gases, como o hexafluoreto de silício e perfluopropano ou por óleo de silicone (Castellarin et al., 2003).

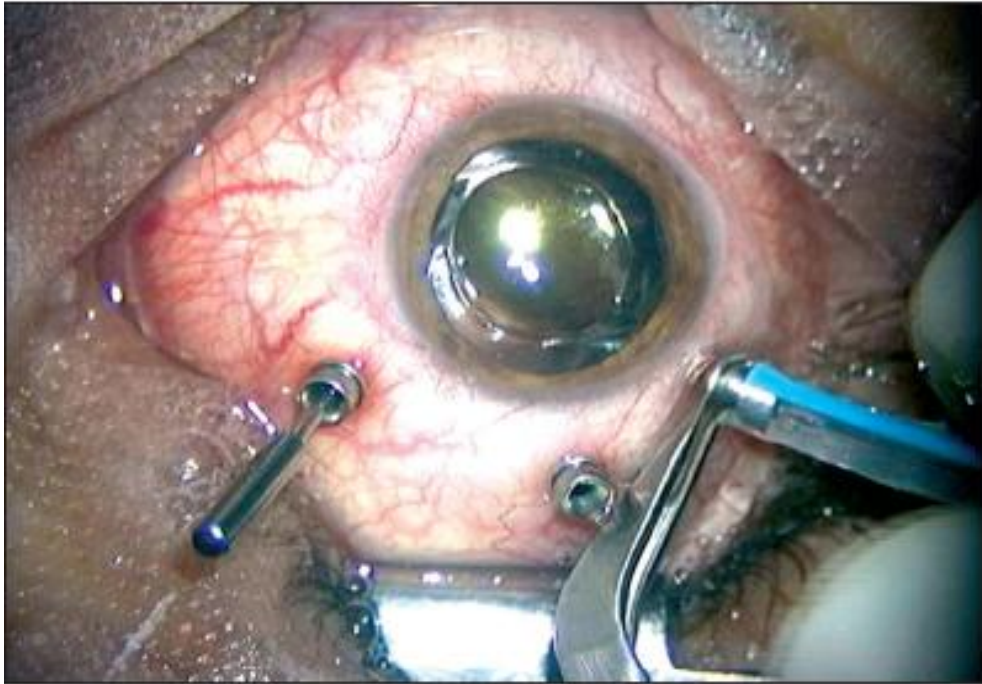


Figura 3 – Cirurgia de vitrectomia *pars plana* (Fonte: Siqueira et al., p. 906,2007).

Von Graefe, em 1863, realizou a primeira operação na cavidade vítrea, o qual removeu um corpo estranho pela vitrectomia *pars plana* usando como instrumento uma pinça e uma agulha. O desenvolvimento de instrumentos para a cirurgia de vitrectomia fechada aumentou a segurança e a efetividade da técnica, contribuindo para o aumento das indicações para este procedimento (Paques, 2006).

2.2.2.5.1 Indicações da cirurgia de vitrectomia

As indicações iniciais da cirurgia de vitrectomia foram largamente estabelecidas por volta de 1980 (Aaberg, 1981). As principais indicações são casos de hemorragia vítrea de longa duração (maior que um mês) e no tratamento do descolamento de retina tracional as quais são as maiores complicações da RD proliferativa (Wilkes, 1993). A Quadro 1 apresenta outras indicações da cirurgia de vitrectomia.

Quadro 1 - Indicações da cirurgia de vitrectomia devido a complicações da retinopatia diabética (Fonte: Adaptado de Smiddy e Flynn, 1999).

1. Hemorragia no Vítreo
2. Hemorragia subhialóide
3. Neovascularização do segmento anterior com hemorragia no segmento posterior
4. Descolamento da retina por tração ou regmatogênico
5. Proliferação fibrovascular no hialóide anterior
6. Síndrome fibrinóide
7. Membranas fibrovasculares na retina

Desde que a cirurgia vitreoretiniana foi introduzida há 30 anos, a evolução tem sido constante principalmente pelo desejo de se obter instrumentos menores e de maior eficiência e dessa forma aumentar a gama de doenças a serem cobertas com este tipo de procedimento (Hagemann et al., 2006).

Chen, em 1996, foi o responsável pelo desenvolvimento de esclerectomias sem suturas na vitrectomia *pars plana*, porém a técnica era baseada em túneis convencionais na esclera e assim várias complicações foram reportadas. Foi relatado também, dificuldades para a passagem dos instrumentos quando se utilizavam os túneis e, além disso, era necessário a dessecação da conjuntiva o que quase sempre requeria sutura (Fujii et al., 2002).

Fujii e colaboradores, em 2002, desenvolveram um sistema para a cirurgia de vitrectomia que permite que o procedimento seja realizado sem sutura. O sistema foi chamado de Transconjunctival Sutureless Vitrectomy (TSV) e utilizava instrumentos (cânulas) com o tamanho de 25 gauge. Fuji e colaboradores descreveram no trabalho publicado, o sucesso do tratamento de todos os casos de descolamento da retina com o sistema TSV. Toda a técnica é realizada sem sutura na esclera ou na conjuntiva o que dessa forma, evita reações inflamatórias relacionadas com a sutura. Estes autores relataram a segurança do sistema, e que o mesmo pode ser usado para várias doenças do segmento posterior. As vantagens de se utilizar o TSV são a resolução do tempo de cirurgia e a menor resposta inflamatória no pós-

operatório, quando se compara com incisões convencionais na esclera e na conjuntiva (Fugii et al., 2002).

O principal objetivo da vitrectomia é remover o humor vítreo e o tecido fibroso da retina. A remoção do vítreo e do tecido fibroso é importante para aumentar a capacidade de “recolamento” da retina (Saxena e Gopal et al., 1996; Smiddy e Flynn, 1999; Sakamoto et al., 2002; Yamakiri et al., 2006).

2.2.2.5.2 Óleo de silicone na vitrectomia

Óleos de silicone (SO, do inglês - *silicone oil*) são polímeros de polidimetilsiloxano. É um líquido de aspecto viscoso, por existirem átomos de oxigênio intercalados com átomos de silício ao longo de toda a molécula. Estes átomos de oxigênio conferem uma maior mobilidade à molécula, permitindo que deslizem umas sobre as outras. O impedimento estérico causado pelas moléculas de CH₃ também auxilia neste processo, repelindo as cadeias umas das outras. A síntese do polidimetilsiloxano pode ocorrer a partir do cloreto de dimetilsilano, como apresentado na Figura 4 (Souza, 2007).

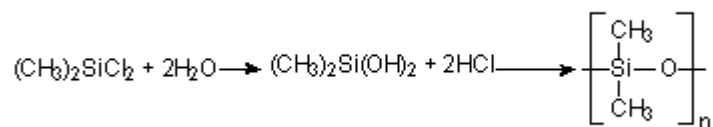


Figura 4 – Estrutura do óleo de silicone (Fonte: Souza, 2007).

As diferenças entre os SO são determinadas pelo comprimento da cadeia polimérica, a qual afeta a viscosidade e os radicais de hidrocarboneto presentes (Saxena e Gopal, 1996). O SO não fluorado apresenta viscosidade entre 1000 e 12000 centistoke (cSt), enquanto o fluorado apresenta viscosidade entre 1000 e 10000 e o de alta tecnologia de 170 a 200. A densidade do primeiro é de 0,97 g/cm³, enquanto do segundo de 1,29 g/cm³ e o terceiro de 1,16 g/cm³ (Paques, 2006).

Paul Cibis (1962) foi o responsável pela popularidade do uso do SO intraocular, mas foi somente Haut (1978) quem usou o SO como tamponamento interno após vitrectomia. Atualmente o SO é utilizado como um tampão intraocular que em conjunto de técnicas avançadas de cirurgia vítrea pode tratar com sucesso casos complicados de descolamento da retina, vitreorretinopatia proliferativa, retinopatia diabética proliferativa, roturas gigantes e traumas oculares (Wickham et al., 2007; Siqueira et al., 2009; Romano et al., 2010). O SO facilita a “colagem” da retina por fornecer um tamponamento intraocular prolongado (Castellarin, et al., 2003). A propriedade tamponante do SO surge da diferença de densidade entre este e o humor vítreo. A tensão superficial do SO pressiona a retina contra a coróide (Spitzer et al., 2009). O SO usado neste trabalho foi o que apresenta densidade de $0,97 \text{ g/cm}^3$ e, portanto, mantém contato apenas com a retina superior, ao contrário do fluorado e de alta tecnologia, que mantém contato não só com a retina superior, mas também com a inferior (Paques, 2006).

Várias alterações histológicas da retina foram descritas após a vitrectomia e a injeção de SO. Essas alterações incluem: vacúolos nos segmentos externos dos fotorreceptores, afinamento ou desaparecimento subtotal dos processos das células bipolar e horizontal e dos terminais sinápticos dos fotorreceptores, afinamento da camada de fotorreceptores, edema intercelular da retina externa envolvendo células bipolares e fotorreceptores, afinamento ou desaparecimento da camada plexiforme externa, degeneração de células ganglionares dentre outros. A pressão exercida pelo SO na retina superior pode, por quatro semanas, levar à isquemia. Esta isquemia libera neurotransmissores, como o glutamato, que culminam com a morte das células da retina (Paques, 2006).

Além das complicações relacionadas com o SO, existem também, as complicações que ocorrem após a cirurgia de vitrectomia que serão detalhadas a seguir.

2.2.2.5.3 Complicações após cirurgia de vitrectomia

As principais complicações após cirurgia de vitrectomia *pars plana* em pacientes com RD proliferativa são hemorragias vítreas recorrentes, descolamento da retina e a re proliferação de membranas ao longo da superfície da retina e da base do vítreo (Scholes et al., 1985; Smiddy e Flynn, 1999; Castellarin et al., 2003 ; Lee et al., 2006; Ahmadeih et al., 2008; Romano et al., 2010).

A incidência de hemorragia vítrea recorrente em pacientes com RD proliferativa após cirurgia de vitrectomia atinge 12 a 63% dos casos (Lee et al., 2007). Hemorragia vítrea recorrente pode ser causada pela dissolução de coágulos de sangue presos no vítreo remanescente, restos de tecido fibrovascular, dentre outras. No entanto, a causa mais comum de hemorragia vítrea após vitrectomia é a re proliferação de tecido fibrovascular na retina (Smiddy e Flynn, 1999).

O descolamento da retina após vitrectomia pode ser causada por vitreorretinopatia proliferativa (VRP) que ocorre quando não há uma remoção total do vítreo posterior da membrana limitante interna da retina, o que resulta no ancoramento de membranas retinianas e conseqüentemente levam ao descolamento da retina (Oliveira et al., 2004).

A pesquisa atual tem focado no desenvolvimento de adjuvantes farmacológicos capazes de reduzir a taxa de re proliferação para serem usados após cirurgia de vitrectomia. Fármacos que têm sido usados na prevenção da formação de membranas no vítreo e descolamento da retina são principalmente os esteróides (Ahmadeih et al., 2008).

2.3 Neuroproteção

A estratégia de tratar uma doença pela prevenção da morte neuronal é chamada neuroproteção. A proteção de neurônios é extremamente importante uma vez que

estes não se dividem após o nascimento e não podem ser repostos quando perdidos. A lesão da retina por isquemia tem sido considerada uma condição potencialmente incurável em humanos e animais de experimentação, porque o sistema nervoso central não tem capacidade regenerativa (Paques, 2006).

A isquemia caracteriza-se por insuficiência de suprimento sanguíneo, reduzindo os níveis de oxigênio e substratos incluindo a glicose. Assim, um declínio do suprimento sanguíneo reduz os níveis de trifosfato de adenosina (ATP). No neurônio, esta redução induz a falência das bombas dependentes de ATP, com subsequente despolarização dos neurônios, induzindo a liberação de neurotransmissores, especialmente o L-glutamato. O glutamato desempenha um importante papel na degeneração neuronal, uma vez que quando presente em grandes quantidades é neurotóxico. Em condições normais o glutamato é convertido nas células gliais em glutamina pela enzima glutamina sintetase. No entanto quando o glutamato está presente em grandes quantidades a enzima não é capaz de catalisar todo o neurotransmissor causando então danos nas células. A liberação deste neurotransmissor leva a produção e ativação de proteases que clivam lipídeos da membrana levando à morte celular (Gorovits et al, 1997).

A pressão exercida pelo SO na retina superior pode, por quatro semanas, levar à isquemia. Esta isquemia libera neurotransmissores que culminam com a morte das células da retina (Paques, 2006).

A literatura descreve a utilização de injeções de triancinolona acetonida após a vitrectomia, mas cabe verificar se este fármaco uma vez em SO apresenta efeito neuroprotetor frente às células da retina.

Na literatura não é relatado o uso de implantes de acetato de dexametasona após cirurgia de vitrectomia em que o humor vítreo foi substituído por SO. Assim, a avaliação do efeito neuroprotetor do fármaco acetato de dexametasona administrados por meio de implantes em SO é de extrema importância para propor uma alternativa clínica para o tratamento tanto das complicações relacionadas com o SO, mas também com as relacionadas com a cirurgia de vitrectomia.

2.4 Antiinflamatórios esteróides intraoculares

Antiinflamatórios esteróides são frequentemente usados como agentes para controle de doenças inflamatórias dos segmentos posterior e anterior do olho. Esteróides inibem a migração de neutrófilos para o espaço extracelular e sua aderência ao endotélio vascular no local da lesão, inibem o acesso de macrófagos ao local da inflamação e interferem com a atividade de linfócitos na resposta imune. Também são responsáveis por inibir a liberação de ácido araquidônico e a síntese de histamina, diminuem a capilaridade, a proliferação de fibroblastos e a quantidade de deposição de colágeno. Portanto, influenciam na regeneração e no reparo do tecido (Bartlett, 1995; Rotsos e Moschos, 2008).

A anormal proliferação de células no interior do olho é frequentemente acompanhada e estimulada pela inflamação intraocular (Jonas, 2005; Acar et al., 2010). Consequentemente, esteróides são usados no tratamento primário de várias doenças da retina devido aos seus efeitos antiinflamatório, antiangiogênico, por contribuírem para a estabilização da membrana das células da retina e suas junções intercelulares da barreira hematorretiniana interna e da barreira hematorretiniana externa e por inibirem a expressão de VEGF (Lee et al., 2007; Ahmadeih et al., 2008; Konstantopolus et al., 2008).

Os esteróides também aumentam a expressão da glutamina sintetase no cortisol das células gliais o que leva a um decréscimo na concentração de glutamato extracelular, diminuindo a morte celular.

Diante desses efeitos, vem sendo proposto à utilização de antiinflamatórios esteróides após vitrectomia *pars plana*, uma vez que poderiam impedir as complicações relacionadas a essa cirurgia (Spitzer et al., 2009) e ao tamponamento promovido pelo SO.

A escolha do esteróide a ser empregado varia de acordo com a doença ocular presente e sua dose deve ser ajustada individualmente. Para uso local, os fármacos mais utilizados clinicamente são a prednisolona, a dexametasona e a betametasona.

Para uso sistêmico opta-se, geralmente, pela prednisona e metilprednisolona, enquanto a triancinolona é preferida para aplicação intra ou periorcular (Oliveira, 2008).

2.4.1 Triancinolona Acetonida

2.4.1.1 Características físico-químicas da triancinolona acetonida

Triancinolona acetonida (TA, do inglês - *triamcinolona acetone*) é um esteróide sintético da família dos glicocorticóides com um átomo de flúor ao invés do hidrogênio na posição nove (Figura 5). A massa molecular do fármaco TA é 434,50 g/mol e sua fórmula empírica é $C_{24}H_{31}FO_6$. É comercialmente disponível como um éster, na forma de um pó branco, pouco solúvel em água, mas solúvel em álcool e álcool metílico. A baixa solubilidade em água faz com que TA tenha uma ação de longa duração, uma vez que forma um depósito no local da injeção (Tao e Jona, 2011). A presença da insaturação e do halogênio na molécula prolonga a meia vida deste fármaco em mais de 50% em relação a hidrocortisona. A TA tem uma maior potencia antiinflamatória tendo como referencia a hidrocortisona (Goodmann, 2006).

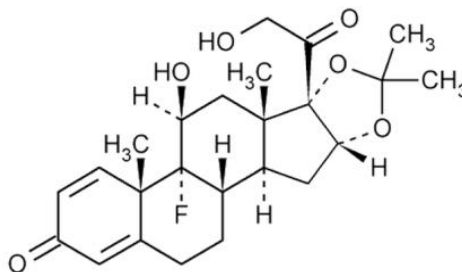


Figura 5 – Estrutura da TA (Fonte: The United States Pharmacopeia, USP 32 p. 3782, 2005).

2.4.1.2 Triancinolona acetona após cirurgia de vitrectomia

A Injeção de TA durante a vitrectomia tem sido utilizada como um corante, com o objetivo de melhorar a visualização da cavidade vítrea para uma remoção mais completa do humor vítreo e verificar se o SO está em contato com a retina (Figura 6) (Peyman e Cheema, 2000). No entanto, sabe-se que a TA desempenha outras funções além desta, as quais são essenciais para evitar uma inflamação exacerbada após a cirurgia (Coult e Bakri, 2008).

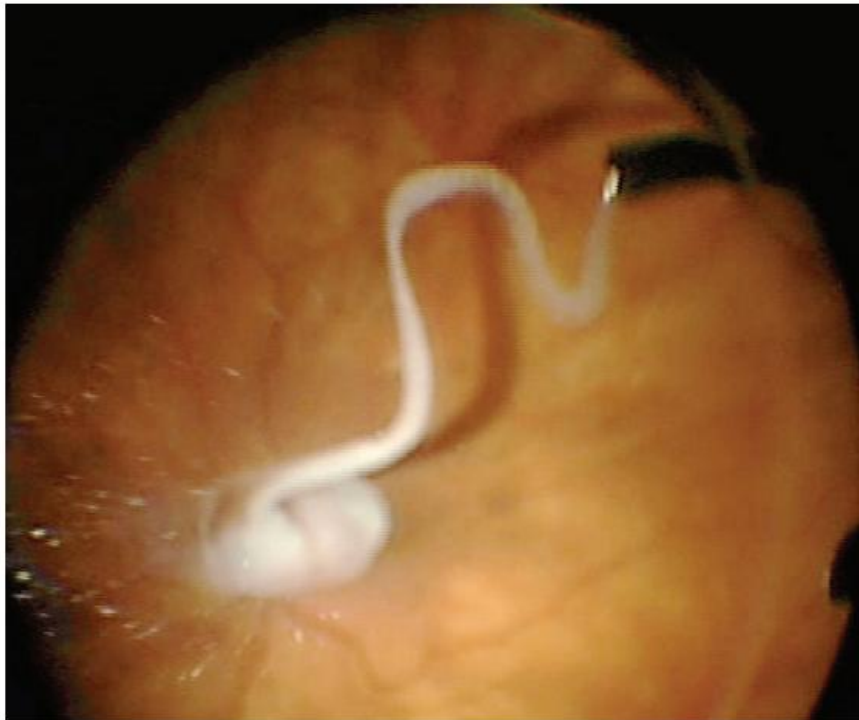


Figura - 6: Injeção de TA durante cirurgia de vitrectomia (Fonte: Coult e Bakri, 2008, p. 893).

Estudos clínicos reportaram que a injeção intravítrea de TA apresenta efeitos antiangiogênicos, antiinflamatórios e antipermeáveis. A ação antiangiogênica é supostamente devido ao decréscimo da expressão de VEGF, tanto direta ou indiretamente por meio de seu efeito antiinflamatório. Normalmente o VEGF é secretado a partir das células gliais, das células do EPR e do endotélio vascular e está presente na retina e no vítreo em baixos níveis. A maior expressão de VEGF

provoca um aumento da permeabilidade vascular, responsável pelo surgimento do edema retiniano e promove a migração e a proliferação de células endoteliais, etapas essenciais para a neovascularização da retina (Rotsos e Moschos, 2008; Tatar et al., 2009; Mendes et al., 2010).

Em um estudo piloto, Jonas e colaboradores (2000), usaram TA intravítrea em paciente submetido à vitrectomia *pars plana* para o tratamento de VRP. O humor vítreo foi substituído por SO e 20 mg de TA foram injetados no final da cirurgia. Os autores reportaram uma redução da inflamação após a vitrectomia e concluíram que a injeção de TA na cavidade vítrea pode ser uma ferramenta adicional no tratamento de VRP.

Munir e colaboradores (2005) também avaliaram os resultados clínicos da injeção de TA em conjunto com a vitrectomia e o SO para o tratamento de VRP e reportaram que dos treze olhos tratados, oito não apresentaram quaisquer sinais clínicos de reproliferação ou redescolamento da retina.

A hemorragia vítrea é a complicação mais comum da vitrectomia *pars plana* no tratamento de RD. A injeção de TA é um dos procedimentos utilizados para tratar hemorragia vítrea recorrente. Ainda não está claro como a injeção intravítrea de TA pode causar o clareamento do vítreo. Estudos propuseram que a sedimentação mecânica do fármaco juntamente com coágulos de sangue na cavidade descendente do vítreo pode desempenhar um papel importante, uma vez que este fenômeno é sempre observado quando o fundo do olho se torna visível. Uma segunda proposta é que TA induza um efeito direto de estabilização vascular (Lee et al., 2006; Lee et al., 2007).

2.4.1.3 Injeção intravítrea de triancinolona acetona

A liberação do fármaco diretamente no vítreo, em casos de doenças do segmento posterior do bulbo do olho, surge diante da necessidade de se manter níveis terapêuticos adequados no local de ação, isto é, no vítreo, na retina, ou na coróide.

Visando manter níveis terapêuticos intraoculares adequados, a via intravítrea tem sido a de escolha para o tratamento de diferentes doenças do olho. A TA pode ser administrada por diversas rotas incluindo injeção intravítrea, injeção periocular e injeção *sub-tenon*. A injeção intravítrea de TA (Figura 7) tornou-se frequente para o tratamento de várias doenças intraoculares proliferativas e edematosas. A sua utilização tem se expandindo pelo mundo inteiro, apesar de não existir nenhum medicamento contendo TA com esta indicação (Fialho e Silva-Cunha, 2007; Sato et al., 2008).

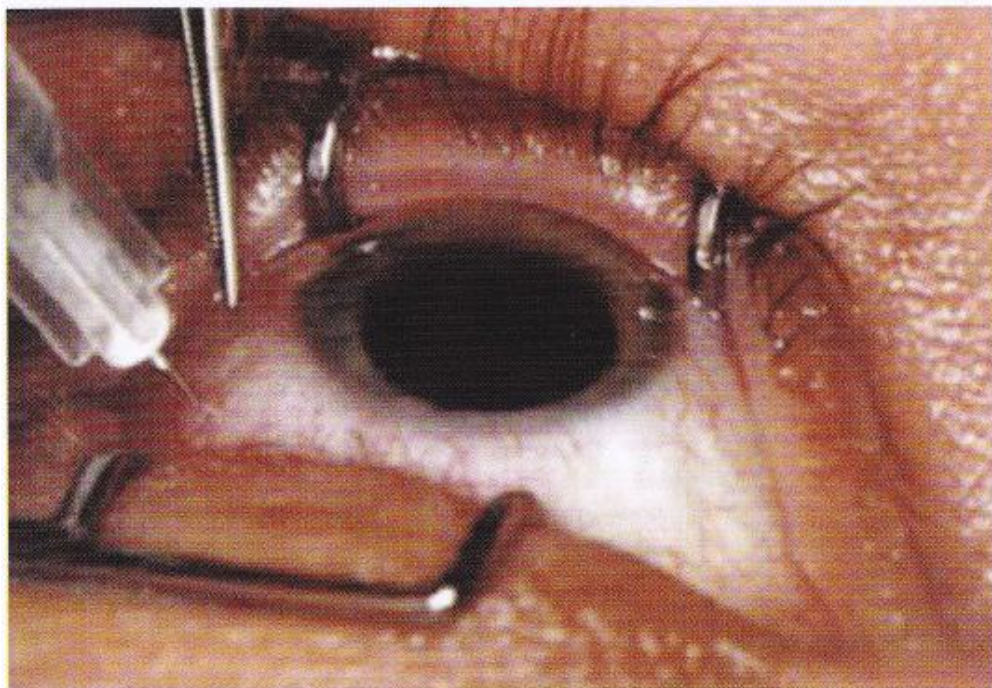


Figura 7 - Injeção intravítrea de TA (Fonte: Oréfice, 2005).

A injeção intravítrea representa um avanço terapêutico frente a outras vias de administração no tratamento de doenças do segmento posterior do olho. No entanto, para manter a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica são necessárias injeções repetidas que podem causar hemorragia vítrea, descolamento da retina, endoftalmite e catarata (Felt-Baeyens et al., 2006). Além disso, as injeções causam um grande desconforto para o paciente o que dificulta sua adesão ao tratamento. Devido a todas as dificuldades encontradas, pesquisas têm sido realizadas no sentido de desenvolver sistemas de administração intraoculares que permitam uma

concentração terapêutica do fármaco por período prolongado. Tais sistemas podem proporcionar inúmeras vantagens, como aumentar a biodisponibilidade do fármaco, no sentido de obter uma liberação constante e prolongada e reduzir a frequência e as complicações das injeções intraoculares. Dentre estes sistemas, os implantes intraoculares são os mais promissores e podem ser elaborados com polímeros biodegradáveis (Fialho e Silva-Cunha, 2007).

2.4.2 Acetato de dexametasona

2.4.2.1 Características físico-químicas do fármaco acetato de dexametasona

Acetato de dexametasona (DA, do inglês - *dexamethasone acetate*) é um esteróide sintético da família dos glicocorticóides (Figura 8). A massa molecular do fármaco DA é 434,5 g/mol e sua fórmula empírica é $C_{24}H_{31}FO_6$. É um pó branco, sem odor, pouco solúvel em água, mas solúvel em álcool e álcool metílico (Goodmann, 2006).

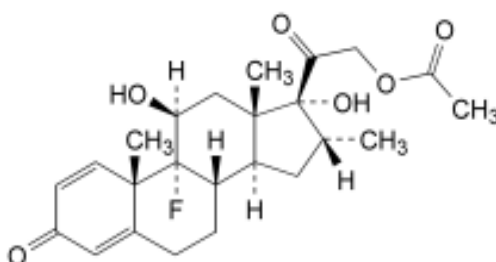


Figura 8 – Estrutura do fármaco DA (Fonte: European Pharmacopeia, p. 1665, 2004).

2.4.2.2 Acetato de dexametasona em doenças intraoculares

Dentre os esteróides, o fármaco DA é um dos mais potentes, com uma atividade antiinflamatória seis vezes maior do que da TA e trinta vezes maior do que do cortisol (Herrero-Vanrell et al., 2011).

DA é um antiinflamatório eficiente no tratamento de doenças agudas e crônicas do segmento posterior do olho, tais como, uveíte, VRP e neovascularização sub-retiniana (Zhang et al., 2009).

A DA intravítrea tem se mostrado eficiente em reduzir o descolamento tracional da retina em animais experimentais modelos para VRP e em reduzir significativamente a inflamação pós-operatória após cirurgia vítreo-retiniana. Uma única injeção de DA também diminui a possibilidade de ruptura da barreira hematorretiniana (Bali et al., 2010).

Estudos em animais e em pacientes têm mostrado que o pré-tratamento com esteróides é mais eficaz na prevenção de VRP. Uma menor incidência de ruptura na barreira hematorretiniana e a inibição da proliferação de células, explicam esse efeito. A DA possui um efeito inibitório na proliferação de células em concentrações relativamente mais altas. A desvantagem de se usar DA por meio de injeções intravítreas é o seu curto tempo de meia-vida, o que limita o seu uso (Bali et al., 2010).

Diante da função benéfica do fármaco DA no tratamento de várias doenças oculares incluindo a RD, o trabalho avalia o perfil de eliminação do fármaco DA administrado por meio de implantes intraoculares em olhos vitrectomizados e compara com o perfil de eliminação do fármaco em olhos não vitrectomizados. O objetivo desta avaliação foi verificar o tempo de permanência do fármaco na cavidade vítrea, e a partir disso, propor uma alternativa clínica para o tratamento das complicações relacionadas com o SO e com a cirurgia de vitrectomia.

2.4.2.3 Implante de acetato de dexametasona

Implantes intraoculares são dispositivos de liberação prolongada de fármaco preparado a partir de polímeros biodegradáveis ou não biodegradáveis. Geralmente esses implantes são introduzidos no vítreo através de uma incisão na *pars plana* do olho. Apesar das características invasivas da técnica de introdução dos implantes,

esses apresentam diversas vantagens que compensam os inconvenientes do procedimento de implantação. Estas vantagens incluem a liberação do fármaco após a barreira hematorretiniana, o que proporciona níveis terapêuticos desejado de forma prolongada, diminuindo os efeitos indesejados observados quando o fármaco é administrado por via sistêmica (Silva et al., 2010). A liberação de fármacos de forma contínua durante semanas ou meses pode ser determinante no tratamento de várias doenças vitreoretinianas, pois mantém níveis terapêuticos enquanto persiste o estímulo causador dessas, ou até a sua cura (Fialho et al., 2003).

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. Estes materiais podem promover um aumento da biodisponibilidade e uma redução de efeitos indesejados, desde que a biocompatibilidade do polímero no olho, que é um importante fator para a aplicação clínica, seja avaliada. Os implantes são preparados a partir de diferentes polímeros, os quais podem ser biodegradáveis ou não biodegradáveis, podendo ser de dois tipos: matriciais (ou monolítico) e reservatórios (Kimura e Ogura, 2001; Fialho et al., 2003).

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 da difusão do fármaco pelo sistema, podendo diferir se este estiver dissolvido molecularmente ou disperso 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 se encontra em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica, a qual controla sua taxa de liberação. 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 (Kimura e Ogura, 2001; Fialho et al., 2003).

Os sistemas compostos por polímeros não biodegradáveis são principalmente os confeccionados a base de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno. Esses sistemas apresentam uma taxa de liberação do fármaco relativamente constante, no entanto, precisam ser removidos posteriormente o que requer procedimentos cirúrgicos. Os sistemas biodegradáveis não precisam ser removidos, pois são totalmente absorvidos pelo organismo. Os polímeros biodegradáveis sintéticos são representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilmacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e proliacrilamidas, dentre os quais os mais utilizados são os poliésteres tais como a poli (ϵ -caprolactona), o poli (DL-lático) (PLA) e os copolímeros derivados do ácido lático e glicólico (PLGA) (Fialho et al., 2003).

Pesquisas mostraram que o PLGA proporciona boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica, baixa toxicidade, excelente biocompatibilidade e uma cinética previsível de biodegradação, a qual pode ser controlada pelas propriedades físico-químicas do polímero tais como a massa molecular, a hidrofiliabilidade e a proporção ácidos lático/glicólico (Zhang et al., 2009).

Os fármacos são liberados dos implantes poliméricos por meio de três etapas. A primeira etapa consiste de uma alta taxa de liberação do fármaco, conhecida como “burst” inicial, possivelmente devido à presença do fármaco na superfície do sistema. A segunda etapa acontece por difusão do fármaco da matriz para o meio externo antes mesmo de ocorrer a erosão da matriz polimérica e está relacionada com o coeficiente de difusão, saturação do meio de incubação e à concentração de fármaco nos sistemas e a terceira fase corresponde a um repentino “burst” devido ao intumescimento e desintegração da matriz propriamente dita (Saliba et al., 2007).

Nos últimos anos, vários estudos referentes ao desenvolvimento de implantes intravítreos de liberação prolongada de dexametasona foram realizados. Um entre estes, o OZURDEX[®] (Allergan INC, Irvini, Califórnia) foi aprovado pelo FDA para uso clínico. O sistema OZURDEX[®] é um implante de liberação lenta de dexametasona que libera 350 ou 700 μ g do fármaco no decorrer de quatro a seis semanas. Este implante apresenta uma característica interessante, uma vez que é implantado por meio de um sistema de injeção que requer apenas uma pequena esclerotomia. Este

sistema libera doses mais altas do fármaco por até seis semanas seguidas de doses mais baixas por até seis meses (Herrero-Vanrell et al., 2011).

Fialho em 2006 desenvolveu implantes biodegradáveis de PLGA contendo 1000 µg de dexametasona visando o tratamento de doenças inflamatórias que acometem o segmento posterior do olho. Os implantes foram inseridos na cavidade vítrea de olhos de coelhos por meio de uma incisão na *pars plana*. O fármaco foi liberado por oito semanas, dentro da faixa terapêutica necessária para suprimir uma inflamação ocular (0,15 a 4,00 µg/mL). Além disso, foi comprovada a biocompatibilidade dos implantes, uma vez que reações tóxicas não foram observadas por meio de eletrorretinografia e exame histológico.

O sucesso alcançado com os implantes contendo DA, estimula estudos adicionais para aplicação clínica destes sistemas em, por exemplo, olhos vitrectomizados.

2.5 Obstáculos à farmacoterapia do segmento posterior

O olho é protegido dos xenobióticos presentes no sangue por meio das barreiras hemato-oculares. Essas barreiras são: hematoaquosa e hematorretiniana. A barreira hematoaquosa é composta pelas células endoteliais da úvea e está localizada no segmento anterior do olho. Essa barreira impede o acesso da albumina plasmática e de fármacos hidrofílicos ao humor aquoso. A inflamação pode comprometer a integridade dessa barreira fazendo com que sua permeabilidade seja aumentada. A barreira hematorretiniana é composta pelas células pigmentares e pelos capilares da retina e está localizada no segmento posterior do olho. Ao contrário da retina, o endotélio capilar da coróide é extremamente irrigado, facilitando o acesso de fármacos no espaço extravascular da coróide. No entanto, a distribuição do fármaco para a retina é limitado pelo EPR. Portanto apenas uma pequena fração do fármaco administrado via endovenosa ou oral tem acesso à retina (Urtti et al., 2006).

Os fármacos administrados pela via intravítrea podem ser eliminados através do segmento anterior do olho pelo humor aquoso, pelo canal de schlemm e através da

retina e da coróide. A difusão de um fármaco no vítreo depende, principalmente, da sua massa molecular e a sua absorção pela retina é regulada pela lipofilia do fármaco. Portanto, a eliminação do fármaco através do humor vítreo está diretamente relacionada com a massa molecular, com a lipofilicidade e com a carga do fármaco. Informações sobre o tempo que o fármaco permanece no olho e a sua eliminação é importante uma vez que pode ajudar a entender a duração da dose terapêutica e a modificar a posologia para uma terapia eficaz (Liu et al., 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Descolamento da retina e hemorragia vítrea são as principais causas de perda da visão em pacientes acometidos por RD proliferativa. O tratamento mais eficaz para essas condições é a vitrectomia *pars plana*. Nesta cirurgia o SO é usado como substituto do vítreo devido à suas propriedades tamponantes. No entanto, frequentes complicações relacionadas com o SO e com a cirurgia de vitrectomia são relatadas. É necessário então, um adjuvante farmacológico, como os esteróides para evitar a ocorrência dessas complicações. Os esteróides são amplamente conhecidos por seus efeitos antiangiogênicos, antiinflamatórios e antipermeáveis e são usados na oftalmologia no tratamento de diversas complicações oculares incluindo a RD proliferativa. O efeito neuroprotetor destes fármacos, também vem sendo relatado uma vez que estes aumentam a expressão da glutamina sintetase que é importante para diminuir a morte celular.

Os esteróides têm sido administrados no segmento posterior do olho por meio de injeções intravítreas, no entanto, para manter uma concentração terapêutica por um período prolongado, são necessárias múltiplas injeções, o que pode causar graves problemas. Assim, uma alternativa a esse quadro tem sido o desenvolvimento de dispositivos tais como os implantes.

A injeção de TA é usada na clínica normalmente na concentração de 4mg/100µL durante a cirurgia de vitrectomia. O fármaco então exerce seus efeitos enquanto permanece na cavidade vítrea. No entanto, a eliminação dos fármacos em olhos vitrectomizados pode ser alterada e assim, a dose de administrada pode ser insuficiente para evitar as complicações relacionadas com o SO e com a cirurgia de vitrectomia e, além disso, não se sabe se a TA na dose administrada é capaz de proteger a retina e evitar a morte celular

Como o principal desafio dos tratamentos utilizados após a vitrectomia está relacionado com a eliminação dos fármacos, os implantes poderiam resolver este problema. Assim, o trabalho procurou determinar o perfil de eliminação do fármaco

TA administrado a partir de injeções intravítreas e do fármaco DA a partir de um sistema implantado em olhos vitrectomizados. Esta informação é essencial para determinação de uma estratégia de tratamento de doenças inflamatórias intraoculares.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de eliminação e a neuroproteção dos fármacos TA, administrado por meio de injeção intravítrea, e DA administrado por meio de implantes intraoculares, em olhos vitrectomizados nos quais o humor vítreo foi substituído por óleo de silicone.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Desenvolver e validar os métodos analíticos de quantificação dos fármacos DA e TA.
- 2) Desenvolver e validar os métodos de extração dos fármacos em óleo de silicone.
- 3) Determinar o perfil de eliminação *in vivo* do fármaco DA, administrado por meio de implantes biodegradáveis constituídos de PLGA, em olhos vitrectomizados.
- 4) Determinar o perfil de eliminação *in vivo* da TA administrada por meio de injeção intravítrea, em olhos vitrectomizados.
- 5) Avaliar a integridade da retina dos grupos estudados, por meio de estudos histológicos.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material

Foram utilizados os seguintes materiais:

- Triancinolona acetona, teor de pureza de 99 % - Sigma Aldrich, Brasil.
- Acetato de dexametasona, teor de pureza de 99 % - Sigma Aldrich, Brasil.
- Triancinolona acetona - Kenalog-40[®] (40 mg/mL, frasco com 1 mL), Bristol – Myers, EUA.
- Óleo de silicone (5000 e 1000 cTs, seringa com 8 mL) - Ophthalmos, Brasil.
- Copolímero ácido láctico / ácido glicólico, PLGA, na proporção de 50:50: i.v (viscosidade intrínseca) aproximadamente 0,45-0,60 dl/g - Resomer[®], Boehringer Ingelheim, Alemanha.
- Acetonitrila – J. T. Barker, grau cromatográfico, EUA
- Metanol – J. T. Barker, grau cromatográfico, EUA
- Água ultra pura Milli-Q, grau cromatográfico.
- Acetato de etila – Vetec, Química Fina, grau cromatográfico, Brasil.
- Cetamina - Ketalar[®] (50 mg/mL, frasco ampola com 10 mL), Park - Davis, Brasil.
- Tiopental sódico - Thionembutal[®] (frascos ampola contendo 0,5 g de detiobarbiturado) Abbott, Brasil.
- Colírio de tropicamida a 1% - Mydracyl[®], Alcon, Brasil.
- Colírio de cloridrato de fenilefrina 2,5% - Fenilefrina[®], Allergan-Frumtost, Brasil.
- Soluções para histologia: Etanol, Formaldeído, Xilol e Hematoxilina-eosina – Reagen Brasil e Merck, Alemanha.
- Espectrofotômetro - Hewlett Packard[®] HP 8453.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters[®] - bomba Waters[®] 515 e auto-injetor Waters[®] 717 plus, detector Waters[®] 486 UV-VIS.
- Coluna cromatográfica - Chromolith[™] C18, de 4,6 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento, partícula de 5 µm, Merck, Alemanha.

- Liofilizador - E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc., EUA.
- Trocater Transescleral - Accurus[®] 25, Gauge System, Alcon, Inc, EUA.
- Aparelho de vitrectomia de alta velocidade - Harmony Total, DORC, Netherlands.
- Microscópio de luz - Axiophot, Zeiss.

5.2 Métodos

5.2.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de análise dos fármacos DA e TA por cromatografia a líquido de alta eficiência

O desenvolvimento dos métodos analíticos para os fármacos TA e DA por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), foi realizado por meio de adaptações de métodos já descritos na literatura e em farmacopéias.

A validação do método foi feita de acordo com a resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o guia de Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (Fevereiro, 2010) e com a European Commission (2002). Para a validação, foram utilizados o espectrofotômetro (Hewlett Packard[®] HP 8453) e o cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters[®] (bomba Waters[®] 515 e auto-injetor Waters[®] 717 plus) acoplado a detector Waters[®] 486 UV-VIS. A coluna utilizada foi a Chromolith[™] C18, de 4,6 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento, com tamanho de partícula de 5 µm (Merk, Alemanha).

5.2.1.1 Desenvolvimento dos métodos analíticos

Primeiramente foi realizada uma varredura dos fármacos DA e TA na região do ultravioleta (UV) em espectrofotômetro (Hewlett Packard® HP 8453). Os padrões de DA e TA foram diluídos em acetonitrila e metanol respectivamente, até uma concentração final de 20 µg/mL, sendo a varredura programada em uma faixa entre 200 a 400 nm, com o objetivo de determinar o comprimento de absorvância máxima do fármaco.

O desenvolvimento do método analítico para o fármaco TA foi feito por meio de adaptações do método descrito na USP 32. O método original preconiza a utilização de coluna C₁₈, de 300 mm de comprimento e fase móvel composta por acetonitrila e água (30:70). Com o objetivo de reduzir o tempo de análise e de separar os interferentes da matriz do fármaco, o tamanho da coluna foi reduzido de 300 para 100 mm e foram testadas diversas proporções de fase móvel composta por acetonitrila e água, com o fluxo no modo isocrático. No entanto, não foi possível obter uma resolução cromatográfica satisfatória entre o fármaco e os interferentes, tornando-se necessária a utilização do fluxo no modo gradiente, o qual proporcionou a separação cromatográfica e rapidez pretendida. Assim, as análises cromatográficas foram realizadas na temperatura ambiente (± 25 °C), a fase móvel utilizada foi a mistura de acetonitrila e água, o volume de injeção foi de 20 µL e foi utilizado o gradiente linear como o modo do fluxo, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Programação da análise cromatográfica com o modo do fluxo gradiente (solução A = água, solução B = acetonitrila).

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)	Eluição
0	90	10	Equilíbrio
0 – 10	90 → 50	10 → 50	Gradiente linear
10 – 15	50	50	Isocrática
15 – 18	50 → 90	50 → 10	Gradiente linear

Em relação ao fármaco DA, foi feita adaptações no método desenvolvido por Fialho (2006). O método original preconiza a utilização de coluna C₁₈, de 150 mm de comprimento, e fase móvel composta por acetonitrila e água (45:55). O tamanho da coluna foi reduzido de 300 para 100 mm e com o objetivo de separar os interferentes da matriz do fármaco, foram testadas diversas proporções de fase móvel composta por acetonitrila e água e fluxos variando entre 1 e 1,5 mL/min.

Assim, as análises cromatográficas foram realizadas na temperatura ambiente (± 25 °C), a fase móvel utilizada foi a mistura de acetonitrila e água (40:60), o volume de injeção foi de 20 μ L e foi utilizado o fluxo de 1,5 mL/min.

5.2.1.2 Validação do método analítico

Todo o método desenvolvido e não descrito em farmacopéia ou formulários oficiais deve ser validado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de quantificação, limite de detecção e estabilidade (Brasil, Brasília, 2003).

Parâmetros avaliados

Linearidade

O estudo de linearidade permite verificar se as soluções das amostras estão em uma faixa de concentração onde as respostas do analito são proporcionais à concentração.

As soluções padrões obtidas para construção das curvas dos fármacos DA e TA foram filtradas em membrana de 0,45 μ m de poro (Durapore, Millipore®) e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste de normalidade de *Ryan-Joiner* e pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a regressão linear.

A concentração de trabalho utilizada para o fármaco DA foi de 5 µg/mL e para o fármaco TA foi de 40 µg/mL.

Construção da curva analítica para o fármaco DA

A curva analítica foi construída com cinco níveis de concentração, nos intervalos de 0,5 a 20 µg/mL. Foram preparadas três soluções estoque de DA na concentração de 100 µg/mL: pesaram-se exatamente 5 mg de DA e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. O volume final foi completado com acetonitrila. Por meio de subsequentes diluições da solução estoque de DA, obteve-se as soluções nas concentrações teóricas para a construção da curva analítica. As diluições foram executadas conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Diluições para construção da curva analítica para quantificação do fármaco DA.

Solução	Balão volumétrico (mL)	Alíquota (mL) da solução estoque de DA 100 µg/mL de acetonitrila	Concentração teórica final µg/mL de acetonitrila
1	100	0,5	0,5
2	50	0,5	1,0
3	10	0,5	5,0
4	10	1,0	10
5	10	2,0	20

Construção da curva analítica para o fármaco TA

A curva analítica foi construída com seis níveis de concentração, nos intervalos de 1 a 120 µg/mL. Foram preparadas três soluções estoque de TA na concentração de 200 µg/mL: pesaram-se exatamente 5 mg de TA e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL. O volume final foi completado com metanol. Por meio de subsequentes diluições da solução estoque de TA, obteve-se as soluções nas concentrações teóricas para a construção da curva analítica. As diluições foram executadas conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Diluições para construção da curva analítica para quantificação do fármaco TA.

Solução	Balão volumétrico (mL)	Alíquota da solução estoque de TA 200 µg/mL de metanol	Concentração teórica final µg/mL de metanol
1	100	0,5	1,0
2	10	0,5	10
3	10	1,0	20
4	10	2,0	40
5	10	4,0	80
6	10	6,0	120

Precisão

A precisão dos fármacos DA e TA foi avaliada em dois níveis: precisão intra-corrída (repetibilidade) e precisão inter-corrídas (precisão intermediária). Para a repetibilidade, foram realizadas seis extrações do fármaco DA (5,0 µg/mL) e TA (40 µg/mL) em SO. A precisão intermediária foi avaliada do mesmo modo, porém as análises foram realizadas em dois dias diferentes.

Exatidão

A exatidão foi determinada preparando-se as soluções com o padrão de DA e soluções com o padrão de TA até obtenção de três concentrações utilizadas para a construção da curva de linearidade de cada fármaco. Em seguida foram adicionados 1 mL de cada concentração em cada três eppendorfs contendo SO solubilizado em acetato de etila. Os eppendorfs foram agitados por cinco minutos e levados à capela para total evaporação dos solventes. Os padrões de DA e TA foram extraídos e analisados, considerando-se que o método é exato quando há proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro. Para DA foram avaliadas recuperações do fármaco nas concentrações de 0,5 µg/mL, 5 µg/mL e 20 µg/mL e para TA foram avaliadas recuperações do fármaco nas concentrações de 1 µg/mL, 20 µg/mL, 80 µg/mL. Foi utilizado um padrão de DA 5 µg/mL e de TA 40 µg/mL como referência.

Especificidade

A especificidade do método para o fármaco DA foi testada analisando-se a extração da amostra de SO do grupo controle (SO sem o fármaco), da amostra de humor aquoso do grupo controle e dos produtos de degradação do polímero PLGA. Para o fármaco TA a especificidade do método foi testada analisando-se a extração da amostra de SO do grupo controle (SO sem o fármaco), da amostra de humor aquoso do grupo controle e a formulação da suspensão injetável do fármaco TA. Os constituintes analisados presentes na formulação do fármaco TA foram álcool benzílico, carboximetilcelulose e polisorbato 80.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes dos fármacos até o menor nível detectável, em triplicata. O limite de quantificação foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes dos fármacos até o menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis.

Estabilidade

Foi feita uma avaliação da estabilidade dos fármacos nas condições utilizadas no processo de extração destes em SO. Os fármacos DA e TA foram diluídos em acetonitrila e metanol respectivamente, até uma concentração final de 20µg/mL. As soluções foram deixadas na capela para evaporação do solvente durante 72 horas. Após o tempo determinado as amostras foram extraídas. O sobrenadante foi analisado por CLAE. O objetivo do estudo de estabilidade foi observar se após 72 horas seriam encontrados produtos de degradação dos fármacos nas amostras de SO.

5.2.2 Desenvolvimento do método de extração dos fármacos DA e TA em SO

5.2.2.1 Dispersão dos fármacos DA e TA em SO

Os fármacos estudados, DA e TA, são insolúveis em SO. Portanto, nesta etapa do trabalho foi desenvolvido um método para dispersar os fármacos no SO.

Em eppendorfs contendo aproximadamente 100 µg de SO, foi adicionado 300 µL do solvente orgânico acetato de etila. Os eppendorfs foram agitados por cinco minutos no vortex até a completa solubilização do SO. Em seguida, foi preparada uma solução estoque com o padrão de DA 5 µg/mL e com o padrão de TA 40 µg/mL, as quais foram levadas ao ultrassom por cinco minutos. Adicionou-se 1 mL das soluções preparadas em eppendorfs contendo SO solubilizado. A mistura foi agitada por cinco minutos no vortex.

Os eppendorfs foram abertos e deixados durante 48 horas na capela de exaustão para completa evaporação dos solventes. Em seguida o fármaco foi extraído pelos solventes selecionados. A Figura 9 esquematiza o procedimento descrito acima.

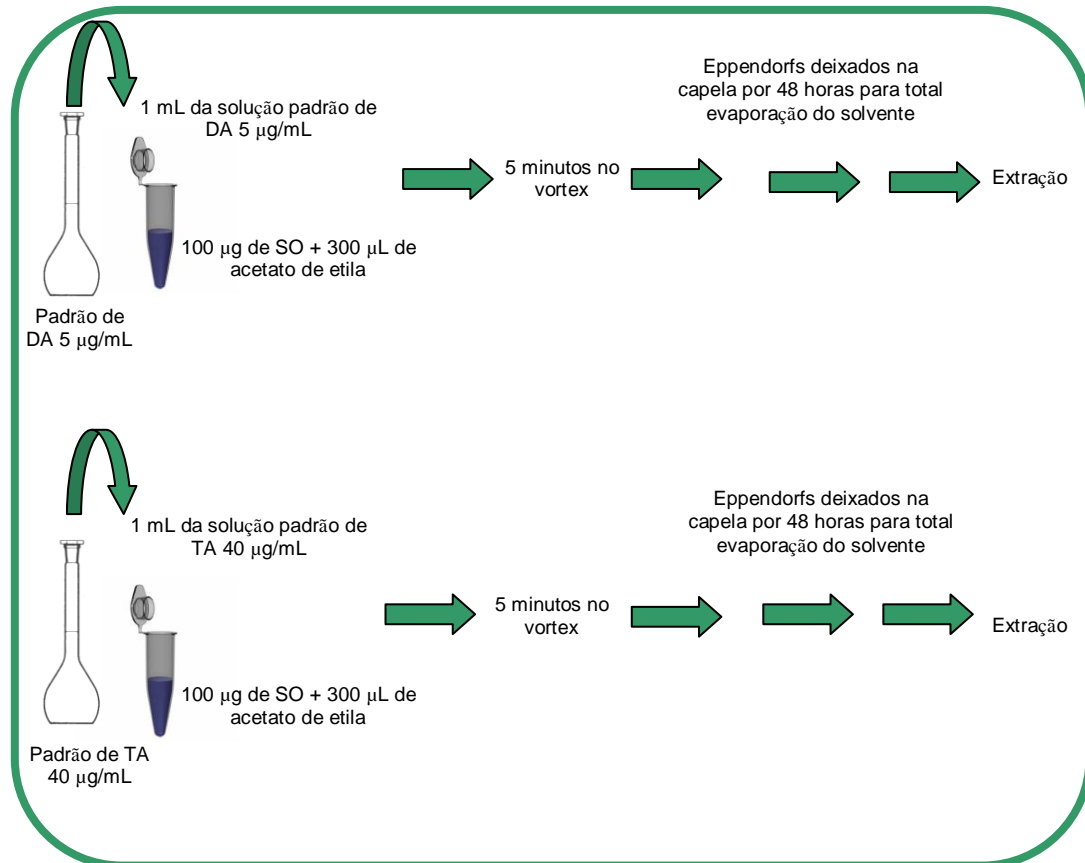


Figura 9 – Esquema do procedimento de dispersão dos fármacos DA e TA no SO para posterior extração.

Após a dispersão dos fármacos em SO, diferentes variáveis como tipo de solvente, tempo e quantidade de solvente foram avaliados a fim de selecionar as melhores condições para extração dos fármacos DA e TA em SO.

5.2.2.2 Seleção dos solventes para extração dos fármacos DA e TA em SO

Os fármacos DA e TA foram extraídos com os solventes orgânicos selecionados de acordo com a polaridade, sendo escolhidos a água, acetonitrila e metanol. Foram adicionados 500 µL de cada solvente orgânico em cada três eppendorfs contendo o SO e o padrão do fármaco DA e TA. Em seguida, os eppendorfs foram agitados em um vortex durante cinco minutos para que a extração ocorresse. Após a agitação, os eppendorfs foram centrifugados por cinco minutos a 2000 rpm. Esse procedimento

foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi coletado e analisado por CLAE. Os dados foram tratados estatisticamente pelo teste de *Tukey's*. A Figura 10 esquematiza o procedimento descrito acima.

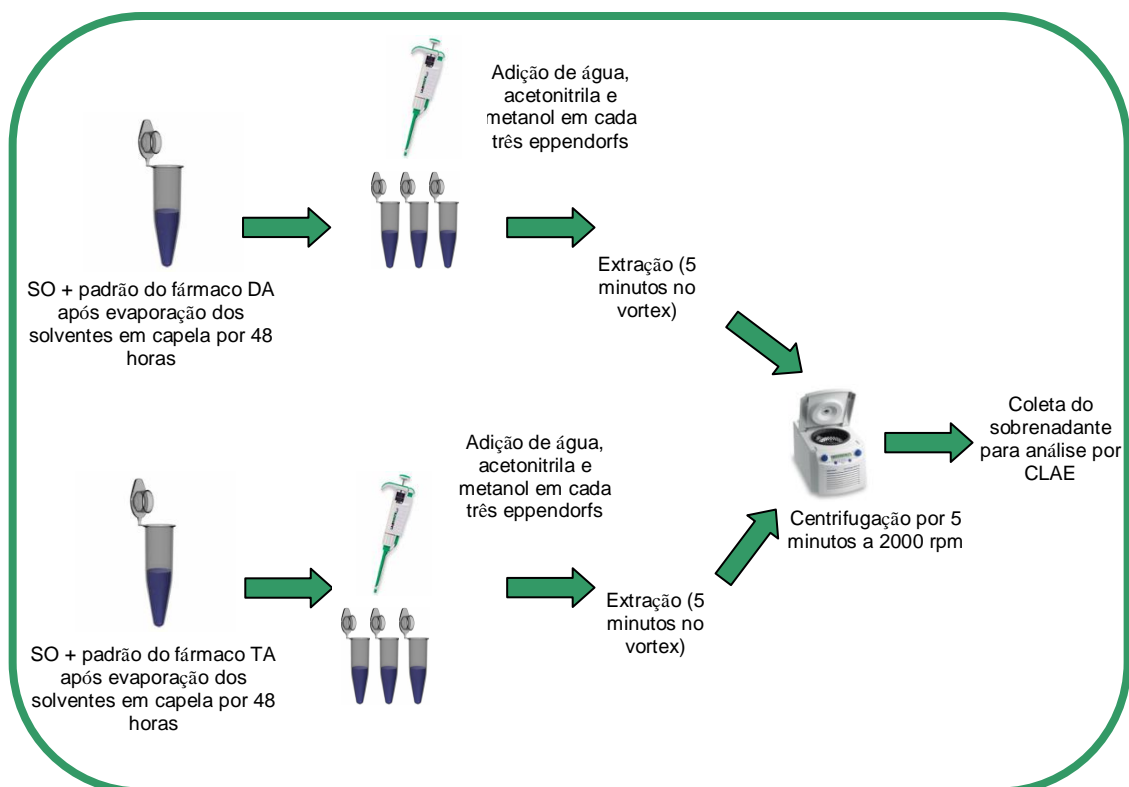


Figura 10 – Esquema do procedimento de extração dos fármacos DA e TA em SO.

5.2.2.3 Seleção da quantidade de solvente e do tempo ideal para a extração dos fármacos DA e TA em SO

Para seleção da quantidade de solvente para extração, foram avaliados extração com duas porções de 500 μ L e uma porção de 1 mL do solvente selecionado. Após a extração os eppendorfs foram centrifugados a 2000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e analisado por CLAE e os dados foram tratados estatisticamente pelo teste *t student*. A Figura 11 esquematiza o descrito acima.

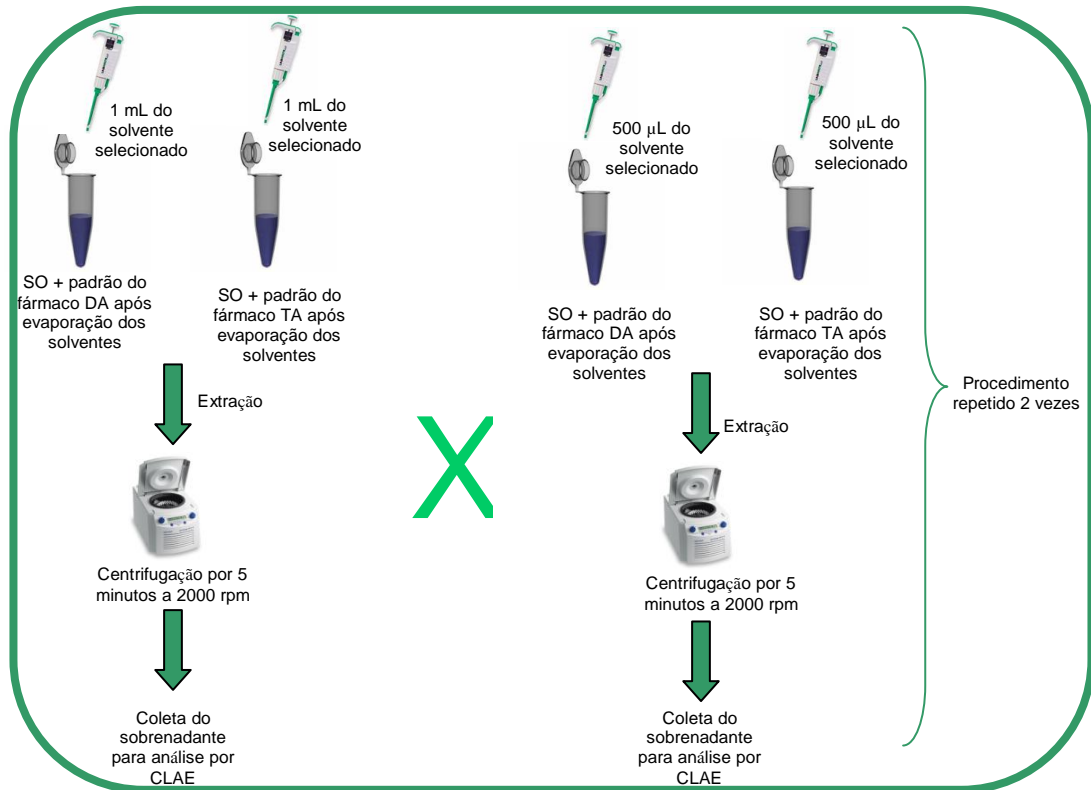


Figura 11 – Esquema do procedimento de extração dos fármacos DA e TA em SO com diferentes quantidades de solvente.

Após a seleção da quantidade de solvente para a extração, foi selecionado o tempo ideal para uma extração eficaz. Foi adicionada determinada quantidade do solvente selecionado em cada três eppendorfs contendo os fármacos TA e DA em SO. Em seguida os eppendorfs foram agitados no vortex por 5, 10 e 15 minutos. Os eppendorfs foram centrifugados por cinco minutos a 2000 rpm. O procedimento foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi coletado e analisado por CLAE. Os dados foram tratados estatisticamente pelo teste de *Tukey's*. A Figura 12 esquematiza o descrito acima.

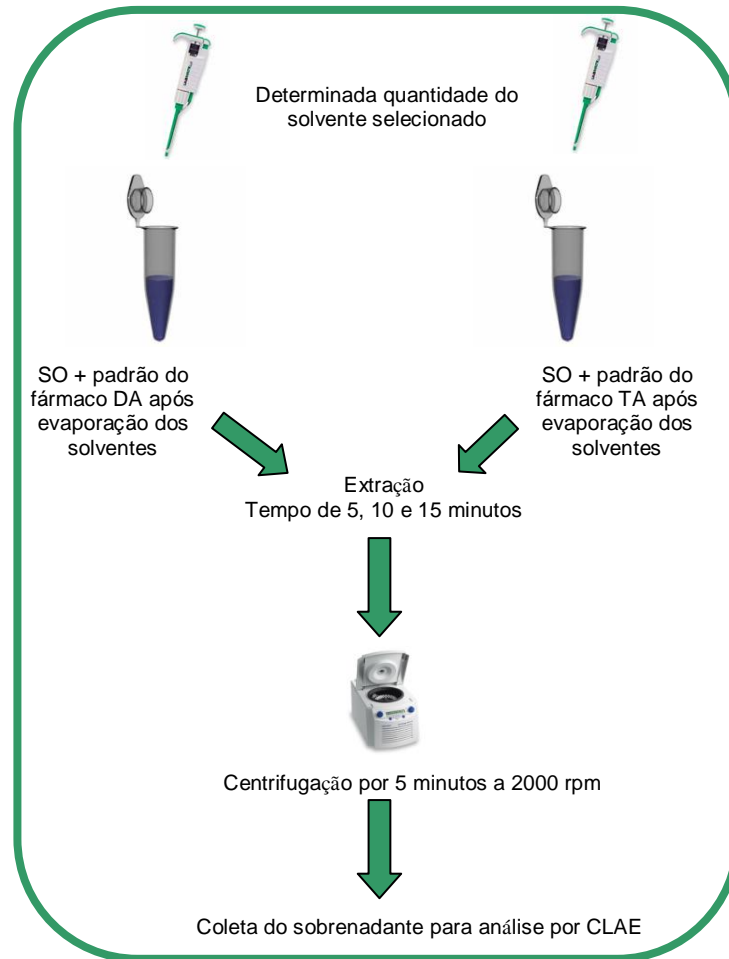


Figura 12 – Esquema do procedimento de extração dos fármacos DA e TA em SO com diferentes tempos de agitação.

Uma vez que foram definidos os parâmetros da extração e que foram desenvolvidos os métodos de dosagem dos fármacos, a etapa seguinte abordará o preparo dos implantes de PLGA e DA, para serem utilizados no estudo *in vivo*.

5.2.3 Preparo dos implantes intraoculares de DA

Os implantes foram preparados pela mistura de PLGA 50:50 (matriz polimérica) e DA (fármaco) de acordo com o método descrito por Fialho (2006).

Para o preparo dos implantes, o fármaco e o polímero foram solubilizados em uma mistura de acetonitrila e água 4:1. A solução resultante foi homogeneizada,

congelada com nitrogênio líquido e em seguida liofilizada (Liofilizador E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc., EUA). A massa obtida foi utilizada para o preparo dos implantes pelo método de moldagem a quente. Nessa técnica, a mistura de pós resultante é moldada sobre uma placa de Teflon[®] aquecida na temperatura entre 100 e 120°C. O fluxograma apresentado na Figura 13 esquematiza as etapas do processo de obtenção dos implantes intraoculares.

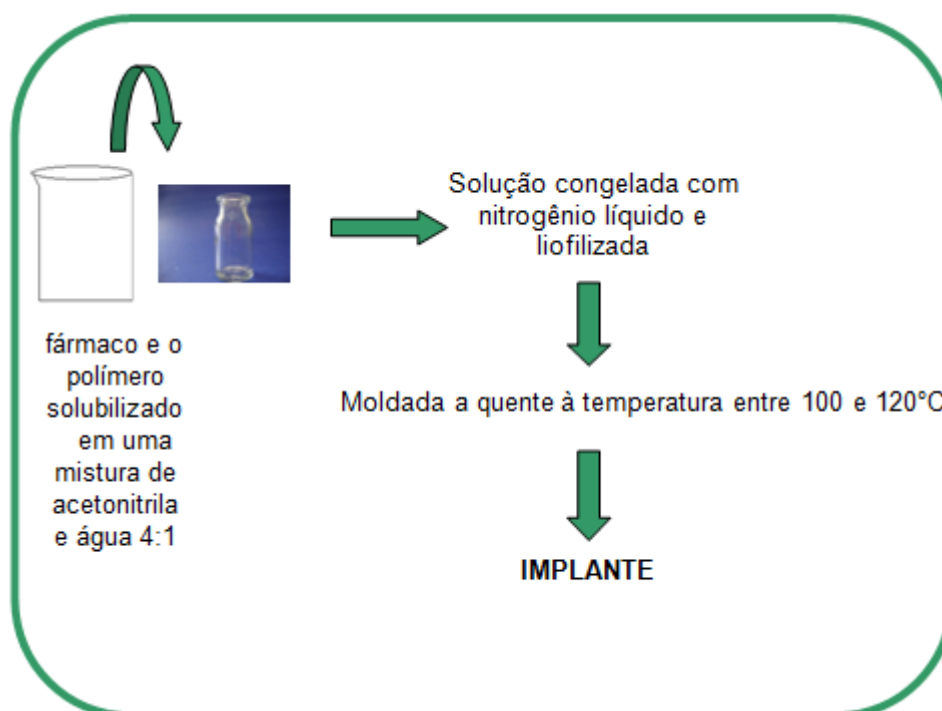


Figura 13 - Preparo de implantes de PLGA e DA.

Os implantes desenvolvidos do fármaco DA apresentaram-se como um sistema monolítico, homogêneo e na forma cilíndrica. O peso médio dos implantes moldados (n=10) foi de $1,71 \pm 0,2$ mg, o diâmetro médio de 1,38 mm e o comprimento médio foi de $6,25 \pm 0,7$ mm. Para a padronização do diâmetro dos sistemas foi utilizado o Trocater Transescleral (Accurus[®] 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA, Figura 14) com a finalidade de obter implantes com espessura adequada para aplicação intravítrea. A Figura 15 representa o implante do fármaco DA.



Figura 14 – Trocater Transcleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA) utilizado na padronização da espessura dos implantes.

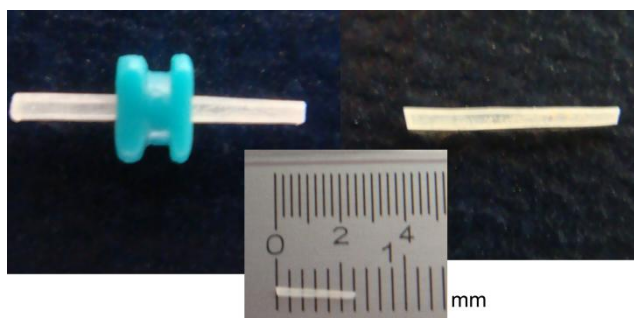


Figura 15 – implante de PLGA contendo o fármaco DA.

Todos os sistemas desenvolvidos apresentavam 27,7 % p/p de acetato de dexametasona, equivalente a 25% p/p de dexametasona e 72,3% p/p de polímero.

5.2.4 Vitrectomia *pars plana*

5.2.4.1 Animais

Foram utilizados dezoito coelhos machos, da raça *New Zealand*, pesando entre 2,0 e 2,5 Kg. Durante o período do estudo, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (USP-RP), em ambiente com temperatura média de 25°C, com ar condicionado e exaustor de ar e luminosidade variando de acordo com a luz solar. Não houve restrição de água e a alimentação utilizada foi ração animal própria para

a espécie. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os pressupostos do Colégio Brasil de Experimentação Animal e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Laboratório (CEUA) da USP-RP.

Os animais foram divididos em três grupos. No grupo 1, o qual serviu como controle, os coelhos foram submetidos à vitrectomia *pars plana* e após a cirurgia foram injetados 1 mL de SO dentro da cavidade vítrea do olho direito de cada coelho. No grupo 2, os coelhos foram submetidos à vitrectomia *pars plana* e após a injeção do SO foi inserido o implante de DA. E no grupo 3, os coelhos foram submetidos à vitrectomia *pars plana* e após a injeção do SO foi realizada uma injeção intravítrea do fármaco TA. O esquema do estudo *in vivo* dos animais submetidos à vitrectomia e dosagem por CLAE Figura 16.

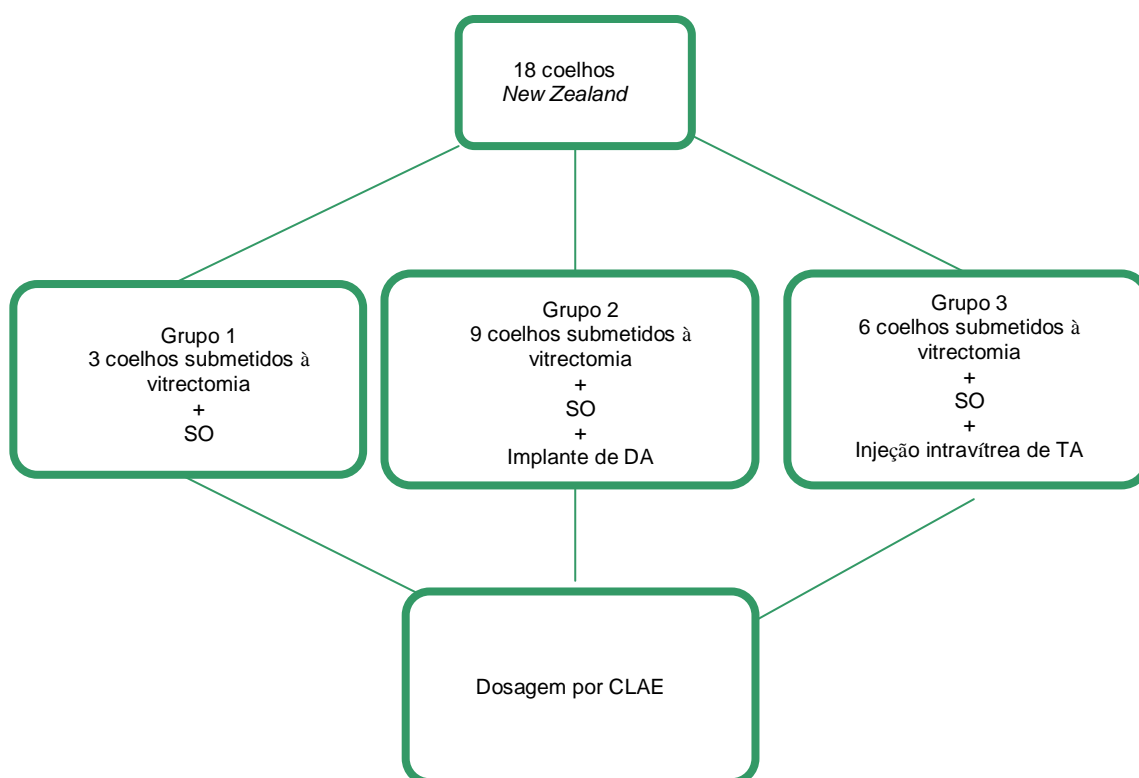


Figura 16 – Esquema do estudo *in vivo* dos animais submetidos à vitrectomia e dosagem por CLAE.

5.2.4.2 Procedimentos

Essa etapa foi realizada com a colaboração do Doutor Rubens Camargo Siqueira na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Os coelhos foram anestesiados com injeção intramuscular de 2 mL de tiopental sódico (50 mg/Kg, Thionembital[®], Abbott, Brasil), para a realização da cirurgia vitrectomia *pars plana*. A dilatação pupilar foi realizada com colírio de tropicamida a 1% (Mydriacyl[®], Alcon, Brasil) e cloridrato de fenilefrina 2,5% (Fenilefrina[®], Allergan-Frumtost, Brasil). Os coelhos foram submetidos à vitrectomia com três acessos, através de esclerotomias localizadas 1 mm posterior ao limbo, utilizando um aparelho de vitrectomia de alta velocidade (Harmony Total, DORC, Netherlands, Figura 17) sob visão panorâmica, fornecida por uma lente de contato (VOLK-XL, Mento, Ohio, EUA)

e sistema de inversão (OPTO, São Carlos, Brasil). Após a vitrectomia *pars plana*, 1 mL de SO (Ophthalmos, Brasil) foi injetado dentro da câmara vítrea do olho operado de cada coelho. Em seguida, foi inserido o implante de DA no grupo 2 e realizada a injeção intravítrea, na qual foram injetados 100 µL do fármaco TA (40 mg/mL Kenalog-40[®], Bristol - Myers, EUA), no grupo 3.



Figura 17 - Aparelho de vitrectomia de alta velocidade (Fonte: Dutch Ophthalmic EUA, 2012).

Dos animais do grupo 2, três foram sacrificados nos intervalos de quatro e oito semanas. Em relação ao grupo 3, três animais foram sacrificados no intervalo de uma e cinco semanas após. Os animais do grupo 1 (controle) foram sacrificados após quatro semanas. O Quadro 2 esquematiza o descrito acima.

Quadro 2 - Animais dos grupos 1, 2 e 3 sacrificados após as seguintes semanas (n=3).

	Semana 1	Semana 4	Semana 5	Semana 8	Semana 9
Grupo 1 (Controle)		x			
Grupo 2 (Implante de DA)		x		x	x
Grupo 3 (injeção de TA intravítrea)	x		x		

* X= animais sacrificados

O SO dos animais sacrificados foi removido da cavidade vítrea e imediatamente colocado em freezer a -80°C até ser feita a análise da concentração dos fármacos.

5.2.5 Estudo Histológico

A histologia da retina dos olhos vitrectomizados que receberam o implante de DA e as injeções de TA foi realizada para verificar o efeito neuroprotetor destes fármacos nas células da retina. As camadas da retina analisada foram as camadas nuclear externa, a nuclear interna e a de células ganglionares.

Foi analisada a retina superior porque o SO usado apresenta uma densidade menor que o vítreo, dessa forma ficou em contato apenas com a retina superior.

5.2.5.1 Animais

Foram utilizados dezoito coelhos machos, da raça *New Zealand*, pesando entre 2,0 e 2,5 Kg. Os coelhos foram alojados no biotério descrito no item 5.2.4.1, com temperatura ambiente controlada, alimentação específica e água.

Os animais foram divididos em três grupos. Cada grupo experimental foi constituído de seis olhos de coelhos. Foram confeccionadas trinta e seis lâminas, onde seis lâminas foram provenientes dos olhos submetidos à vitrectomia e injeção de SO (grupo 1), seis lâminas provenientes dos olhos submetidos à vitrectomia, infusão de SO e implante de DA (grupo 2), seis lâminas provenientes dos olhos submetidos à vitrectomia, infusão de SO e injeção de TA (grupo 3) e as outras dezoito lâminas provenientes dos olhos contralaterais do grupo 1, 2 e 3, categorizados como controle. O esquema do estudo dos animais submetidos a histologia está ilustrado na Figura 18.

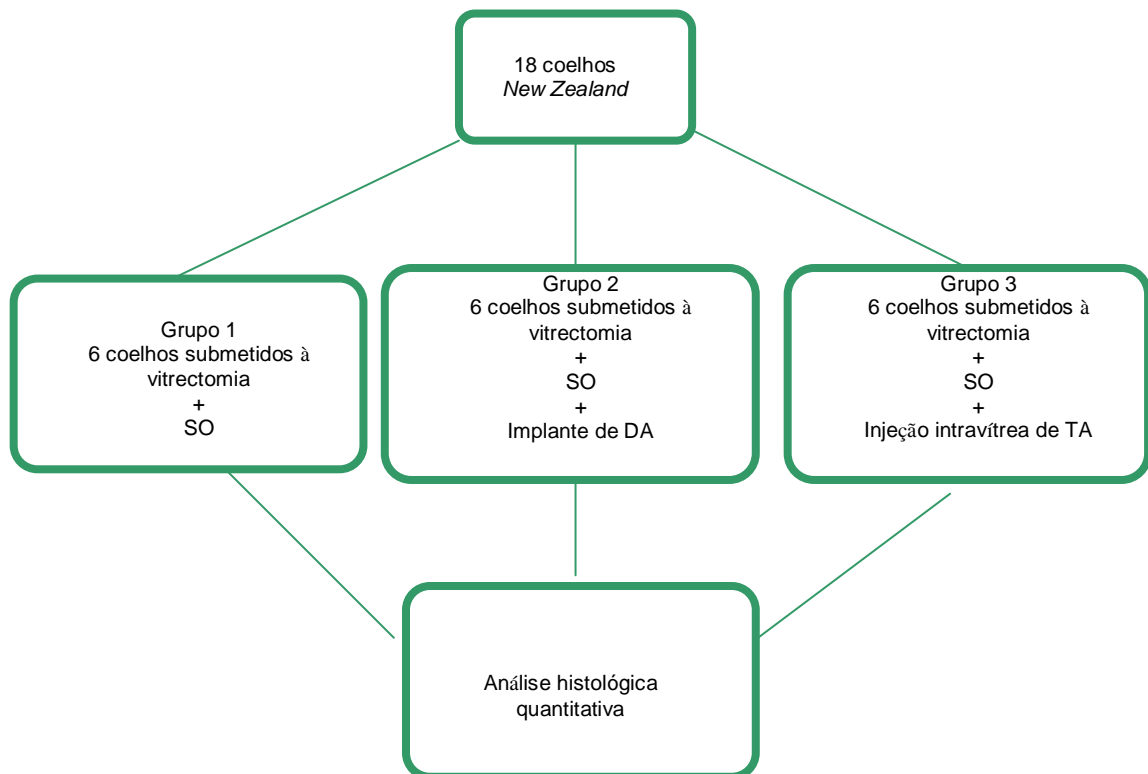


Figura 18 – Esquema do estudo *in vivo* dos animais submetidos à vitrectomia e ao estudo histológico.

5.2.5.2 Procedimentos

Os coelhos foram anestesiados com injeção intramuscular de 2 mL de tiopental sódico (50 mg/Kg, Thionembatal[®], Abbott, Brasil), para a realização da vitrectomia *pars plana*, de acordo com o descrito no item 5.2.4.2.

Os animais foram sacrificados com overdose de tiopental sódico quatro semanas após a cirurgia e seus olhos imersos e fixados em solução de formaldeído a 4 % p/v, por 24 horas.

O SO foi removido e o bulbo do olho cortado em duas partes por uma secção abaixo e paralela ao raio medular. Foram utilizadas as porções superiores uma vez que as lesões provocadas pelo SO estão relacionadas com essa porção. Assim, as porções superiores de cada olho estudado foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol 80 a 100 % e embebidas em parafina para confecção dos blocos. Os blocos contendo os materiais de estudo foram cortados transversalmente a 5 µm e distendidos em lâminas de vidros. Os cortes aderidos nas lâminas foram desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol de 100 a 50 % e depois em água, corados com hematoxilina-eosina, as lâminas montadas e os cortes examinados em microscópio de luz (Axiophot, Zeiss).

A análise quantitativa foi realizada por meio do programa KS400[®] para medir a espessura da camada de células da retina. Os resultados foram expressos em densidade de células (células/mm² ± SEM). As análises estatísticas foram realizadas para verificar a diferença de densidade entre os grupos estudados.

5.2.6 Determinação da quantidade dos fármacos presentes no SO a partir da injeção intravítrea de TA e dos implantes de DA

A quantidade de DA e de TA presente no SO e no humor aquoso dos animais que receberam os implantes preparados e a injeção intravítrea, foi determinada pelo

método de CLAE descrito e validado no item 5.2.1. O SO e o humor aquoso dos animais do grupo 1 também foram analisados e serviram como controle do experimento.

Para a determinação da quantidade de fármaco presente, as amostras de SO foram descongeladas e submetidas à extração de acordo com o item 5.2.2. Após a extração, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 2000rpm. O sobrenadante foi liofilizado e reconstituído em 100 μ L do solvente orgânico adequado. A quantidade de DA e de TA presente no SO foi expressa em μ g/ 100 μ L de solvente.

Para a determinação de fármaco presente nas amostras de humor aquoso, as amostras foram descongeladas e foi adicionado 1 mL do solvente acetonitrila para precipitação das proteínas presentes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi coletado e liofilizado e reconstituído em 100 μ L do solvente orgânico adequado. A quantidade de DA e de TA presente no humor aquoso foi expressa em μ g/100 μ L de solvente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento e validação dos métodos de análise dos fármacos DA e TA

A maioria dos trabalhos descritos na literatura determina a concentração dos fármacos presentes em olhos vitrectomizados, pela quantificação destes no humor aquoso. Neste trabalho foi proposto um método de extração dos fármacos presente no SO, para estudar o papel do SO na eliminação dos fármacos e a consequente importância no estudo *in vivo*.

Como o SO é uma matriz que apresenta interferentes, que possuem polaridades semelhantes aos fármacos estudados, foi necessário a adaptação de métodos descritos em farmacopéias e na literatura para a quantificação do fármaco DA e TA por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).

6.1.1 Desenvolvimento dos métodos analíticos

De acordo com a varredura feita em espectrofotômetro, o maior comprimento de onda (λ) de absorção do fármaco DA foi 235 nm e da TA foi 239 nm, sendo portado, estes os comprimentos de onda usados nas análises em CLAE. A Figura 19 representa o espectro de varredura no UV dos fármacos TA e DA.

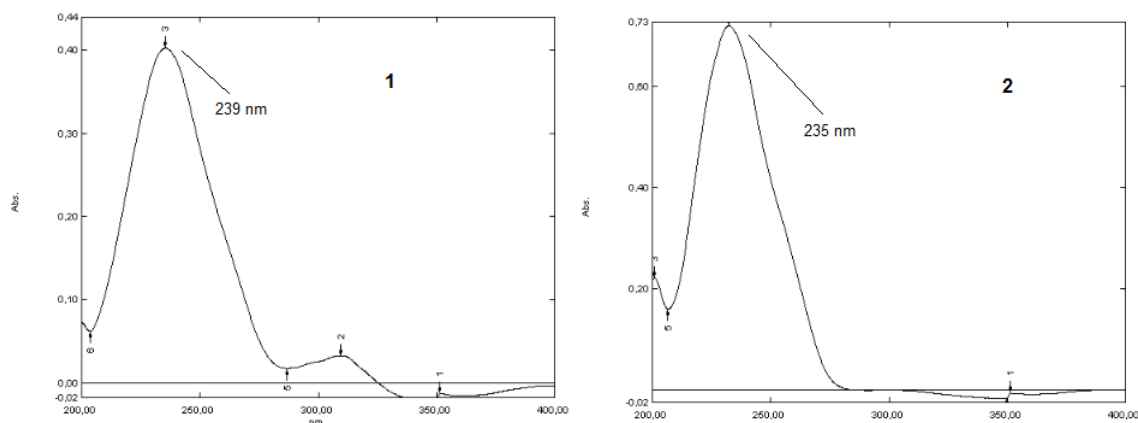


Figura 19 – 1: Espectro de varredura do fármaco TA. 2: Espectro de varredura do fármaco DA.

Em relação ao fármaco TA, a fase móvel escolhida para a sua análise apresentou como composição acetonitrila e a água e o fluxo no modo gradiente, o qual variava a proporção da fase móvel em função do tempo conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Variação da fase móvel em função do tempo.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)	Eluição
0	90	10	Equilíbrio
0 – 10	90 → 50	10 → 50	Gradiente linear
10 – 15	50	50	Isocrática
15 – 18	50 → 90	50 → 10	Gradiente linear

Para determinar a melhor resolução cromatográfica entre o fármaco e os interferentes do SO, da suspensão injetável de TA e do humor aquoso, foi avaliado o tempo de corrida de 18 minutos. O tempo estipulado atendeu o requisito avaliado, obtendo assim, um tempo de retenção do fármaco TA de 12,3 minutos. A Figura 20 representa os cromatogramas das amostras de humor aquoso, da suspensão injetável, do padrão do fármaco TA e da amostra de SO do grupo controle, no tempo de 18 minutos e a Tabela 5 os parâmetros cromatográficos selecionados.

Tabela 5 - Parâmetros cromatográficos utilizados para o fármaco TA na validação do método analítico.

<i>Fase Móvel</i>	<i>Fluxo (mL/min)</i>	<i>Modo do fluxo</i>	<i>Comprimento de onda no UV (nm)</i>	<i>Volume de Injeção (µL)</i>	<i>Temperatura aproximada (°C)</i>
Acetonitrila:Água	1,0	Gradiente	239	20	25

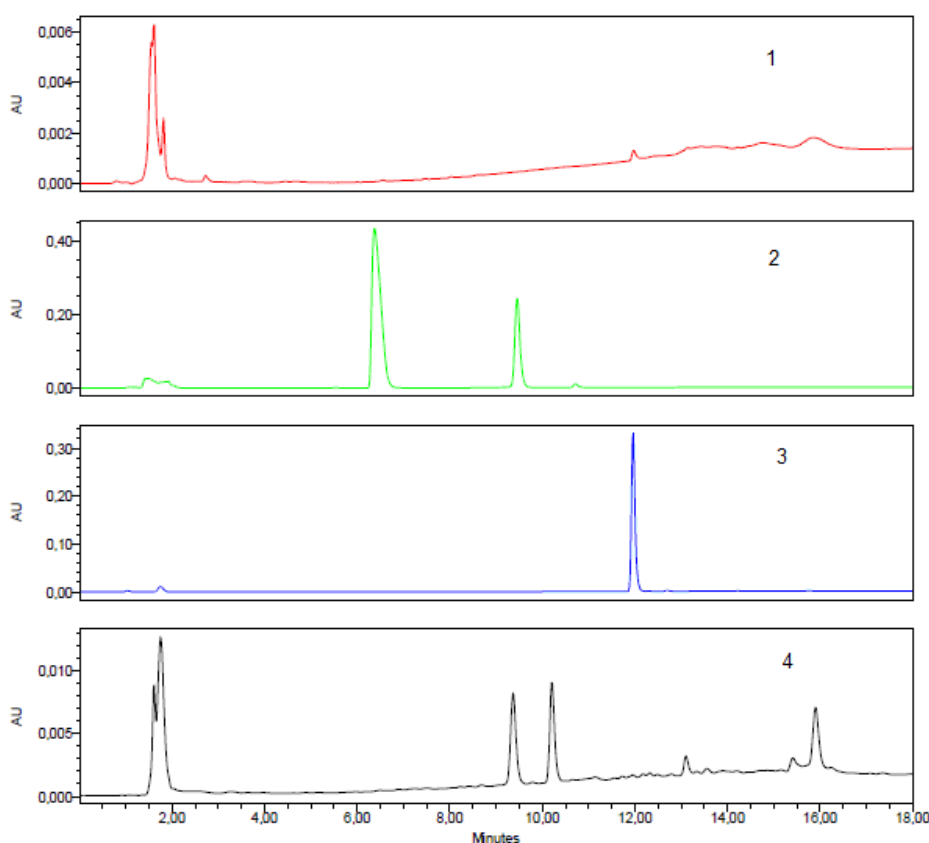


Figura 20 - Cromatograma do humor aquoso do grupo controle (1). Cromatograma da da suspensão injetável do fármaco TA (2). Cromatograma do padrão do fármaco TA (3). Cromatograma da extração do SO do grupo controle (SO sem o fármaco) (4).

Para o fármaco DA, foram avaliados diferentes proporções de fase móvel a qual era composta por acetonitrila e água, até a obtenção de uma resolução cromatográfica satisfatória entre o fármaco e os interferentes, sendo eles impurezas presente no SO, produto de degradação do polímero PLGA e humor aquoso. A fase móvel escolhida foi a composta por 40% de acetonitrila e 60% de água e o fluxo escolhido foi o de 1,5 mL/min, parâmetros em que se obteve o menor tempo de análise e a

melhor resolução cromatográfica entre o fármaco e os interferentes. A Figura 21 representa o cromatograma do fármaco DA com um tempo de retenção de 3,7 minutos, na fase móvel e fluxo selecionado e com um tempo de corrida de sete minutos.

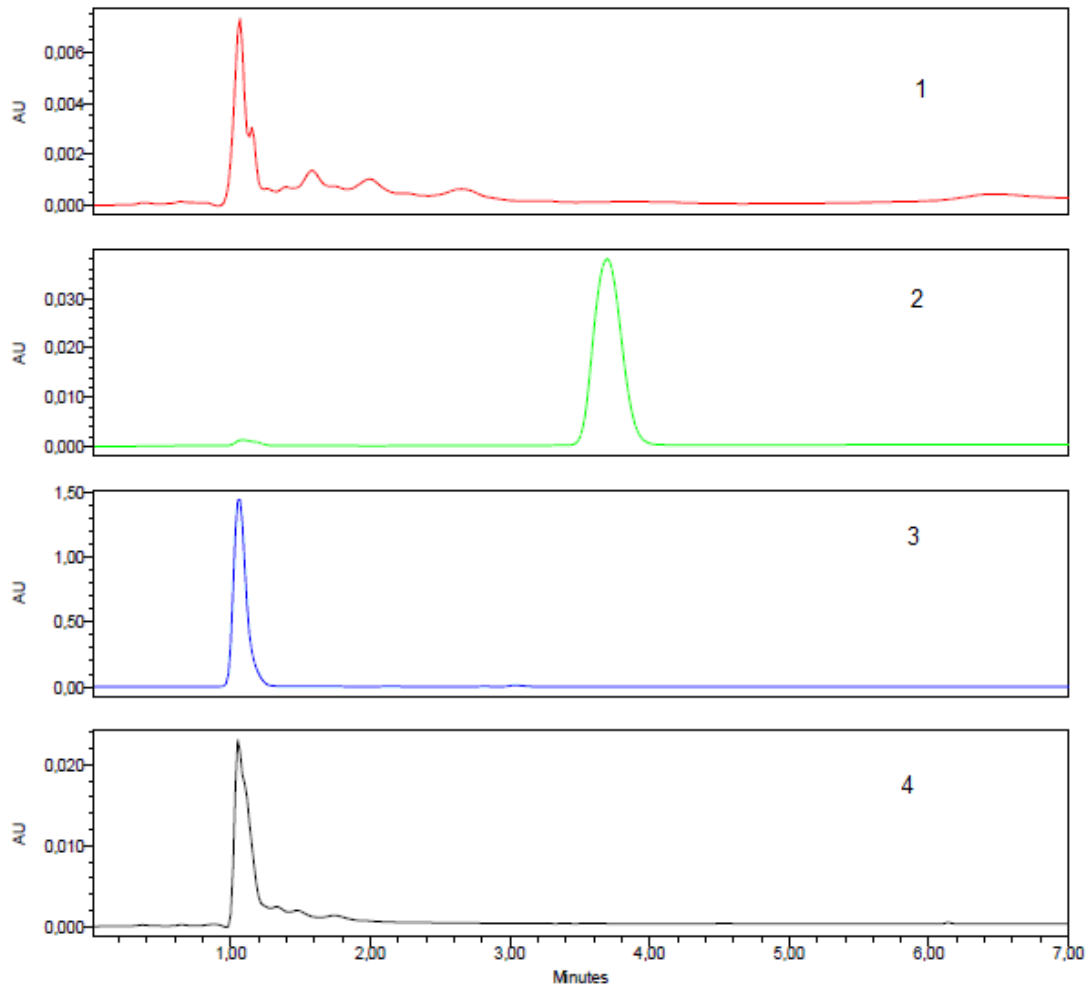


Figura 21 - Cromatograma do humor aquoso do grupo controle (1). Cromatograma do padrão do fármaco DA com o tempo de retenção de 3,7 minutos (2). Cromatograma da extração do SO do grupo controle (SO sem o fármaco) (3). Cromatograma dos produtos de degradação do PLGA (4).

A Tabela 6 apresenta os parâmetros cromatográficos adotados.

Tabela 6 – Parâmetros cromatográficos utilizados para o fármaco DA na validação do método analítico.

<i>Fase Móvel</i>	<i>Fluxo (mL/min)</i>	<i>Modo do fluxo</i>	<i>Comprimento de onda no UV (nm)</i>	<i>Volume de Injeção (µL)</i>	<i>Temperatura aproximada (°C)</i>
Acetonitrila:Água (40:60)	1,5	Isocrático	235	20	25

6.1.2 Validação dos métodos analíticos

Linearidade

Avaliação da linearidade para o fármaco DA

O método se mostrou linear, para o intervalo de concentrações entre 0,5 a 20 µg/mL, conforme equação da reta $Y = 24953x - 1300,2$ e o r^2 obtido foi de 0,9998 o que mostra uma excelente correlação entre a concentração e a resposta obtida. A equação da reta foi obtida calculando-se a média dos valores de inclinação e intercepto com o eixo y encontrado nas três curvas de calibração partindo-se de pesagens diferentes. Os dados utilizados para a construção da curva de calibração e a média das três curvas são mostrados na Tabela 7 e Figura 22.

Tabela 7 - Dados da construção da curva de calibração para o fármaco DA.

	<i>Curva do fármaco DA</i>	
Concentração µg/mL em solvente orgânico	Média das áreas ± DP	DPR (%)
0,5	11926 ± 591	4,95
1	25136 ± 18	0,07
5	123969 ± 3377	2,72
10	243186 ± 8610	3,54
20	500053 ± 3764	0,75

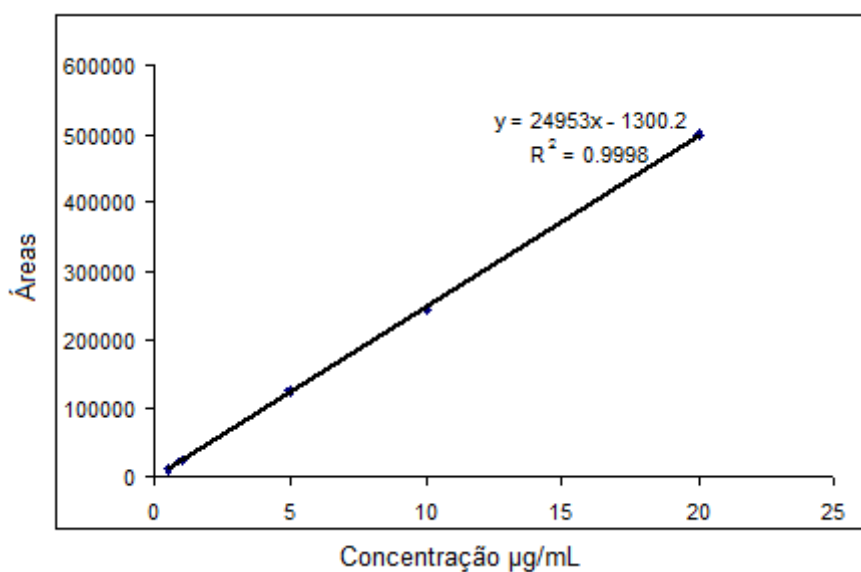


Figura 22 - Curva de calibração do fármaco DA obtida na avaliação da linearidade.

Foi verificada pelo teste de *Ryan-Joiner* a normalidade dos resíduos obtendo-se um R (coeficiente de correlação do gráfico de probabilidade normal) calculado maior que o R crítico comprovando a distribuição normal dos resíduos. Por meio de análise de variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados do tratamento estatístico por análise de variância para a regressão linear para o fármaco DA.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Média dos quadrados</i>	F
Regressão	1	778,9	778,9	20938,9*
Resíduo	13	0,4835	0,037	
Total	14	779,4		
Estatística de regressão e coeficientes				
R²	0,9998			
Inclinação	24953			
Intercepto	(-) 1300,2			

* Valor significativo ($\alpha = 0,05$)

Avaliação da linearidade para o fármaco TA

O método se mostrou linear, para o intervalo de concentrações entre 1 a 120 µg/mL, conforme equação da reta $Y = 40475x + 43344$ e o r^2 obtido foi de 0,9992 o que mostra uma excelente correlação entre a concentração e a resposta obtida. Os dados utilizados para a construção da curva de calibração e a média das três curvas são mostrados na Tabela 9 e Figura 23.

Tabela 9 - Dados da construção da curva de calibração para o fármaco TA.

Concentração µg/mL de solvente orgânico	Curva do fármaco TA	
	Média das áreas ± DP	DPR (%)
1	36837 ± 963	2,61
10	452500 ± 18056	3,99
20	871677 ± 20084	2,30
40	1737176 ± 70463	4,05
80	3212238 ± 51933	1,61
120	4918351 ± 191649	3,89

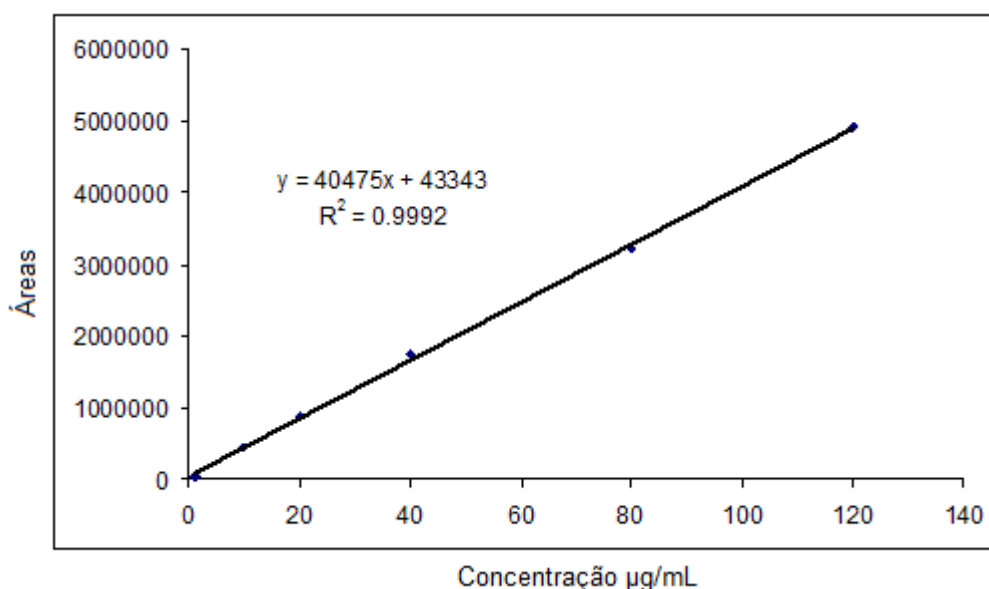


Figura 23 - Curva de calibração do fármaco TA obtida na avaliação da linearidade.

Foi verificada pelo teste de *Ryan-Joiner* a normalidade dos resíduos obtendo-se um R (coeficiente de correlação do gráfico de probabilidade normal) calculado maior que o R crítico, comprovando a distribuição normal dos resíduos. Por meio de análise de variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$). (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados do tratamento estatístico por análise de variância para a regressão linear para o fármaco TA.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Média dos quadrados</i>	F
Regressão	1	$5,23 \times 10^{10}$	$5,24 \times 10^{10}$	6444,2*
Resíduo	16	$1,30 \times 10^{10}$	$8,1 \times 10^{10}$	
Total	17	$5,25 \times 10^{10}$		
Estatística de regressão e coeficientes				
R²	0,9992			
Inclinação	40475			
Intercepto	43344			

* Valor significativo ($\alpha = 0,05$)

Precisão

Os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária para os fármacos DA e TA foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) e encontram-se na Tabela 11 e 12, respectivamente. Todos os valores de DPR obtidos, tanto para a precisão intra-corrída quanto para a precisão inter-corrídas de ambos os fármacos, encontram-se abaixo de 5%, estando de acordo com o que preconiza a resolução 899 da ANVISA, o que evidencia repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão.

Tabela 11 - Valores de desvio padrão relativo da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico para dosagem do fármaco DA.

<i>Dia 1</i>		<i>Dia 2</i>	
Amostra	Concentração (µg/mL)	Amostra	Concentração (µg/mL)
1	5,23	1	5,28
2	5,13	2	4,99
3	5,12	3	5,18
4	5,20	4	5,14
5	5,07	5	5,15
6	5,09	6	5,07
Média	5,14	Média	5,13
Desvio padrão	0,06	Desvio padrão	0,09
DPR	1,22	DPR	1,92

Tabela 12 - Valores de desvio padrão relativo da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método analítico para dosagem do fármaco TA.

<i>Dia 1</i>		<i>Dia 2</i>	
Amostra	Concentração (µg/mL)	Amostra	Concentração (µg/mL)
1	36,07	1	34,17
2	35,75	2	35,09
3	37,30	3	34,33
4	36,20	4	33,54
5	37,09	5	33,04
6	35,24	6	34,70
Média	36,27	Média	34,14
Desvio padrão	0,79	Desvio padrão	0,75
DPR	2,17	DPR	2,20

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir dos resultados de recuperação do fármaco DA em SO, em concentrações de 0,5 µg/mL, 5 µg/mL e 20 µg/mL e do fármaco TA em SO, em concentrações de 1 µg/mL, 20 µg/mL e 80 µg/mL. As porcentagens de recuperação caracterizam o método como exato de acordo com o que preconiza a EC 2002 (European Commission, intervalo 80-110%, para concentrações maiores que 0,1 mg/Kg) e estão apresentadas na Tabela 13 e 14 para o fármaco DA e TA, respectivamente.

Tabela 13 - Porcentagem de recuperação da DA adicionada ao SO para a avaliação da exatidão do método.

	0,5 µg/mL	5 µg/mL	20µg/mL
Recuperação (%)	97,6	102,0	96,9
	101,0	103,0	102,9
	102,0	94,3	103,7
Média	100,2	99,7	101,2
Desvio Padrão	1,88	3,88	3,01

Tabela 14 - Porcentagem de recuperação da TA adicionada ao SO para a avaliação da exatidão do método.

	1,0 µg/mL	20 µg/mL	80µg/mL
Recuperação (%)	97,0	100,5	103,0
	96,5	102,0	101,0
	100,3	104,0	95,6
Média	97,93	105,1	99,86
Desvio Padrão	2,06	1,75	3,82

Especificidade

A especificidade do método para o fármaco DA foram avaliadas a partir de análises de cromatogramas obtidos da extração das amostras de SO grupo controle (SO sem o fármaco), das amostras de humor aquoso do grupo controle e dos produtos de degradação do PLGA. Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 24.

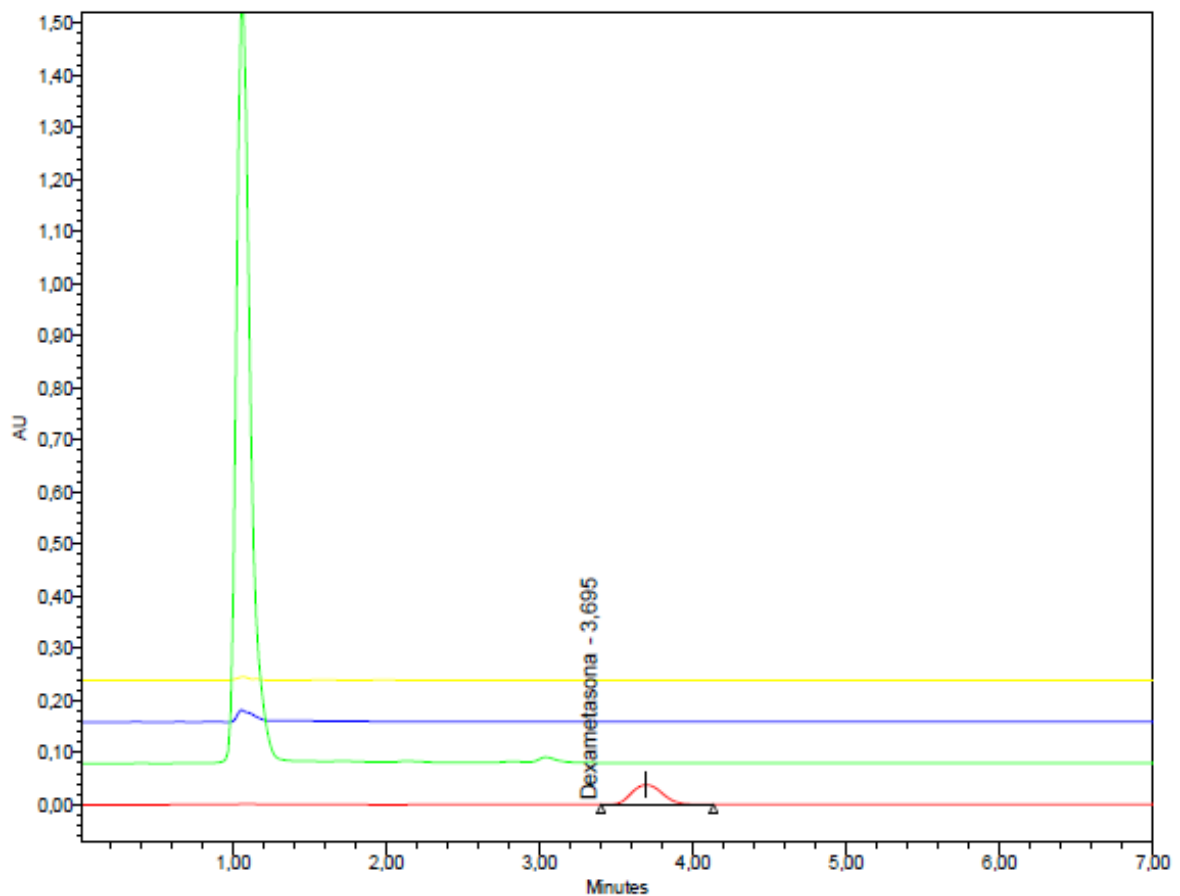


Figura 24 - Cromatograma do humor aquoso grupo controle (amarelo). Cromatograma dos produtos de degradação do PLGA (azul). Cromatograma da extração do SO do grupo controle (SO sem o fármaco) (verde). Cromatograma do padrão do fármaco DA (vermelho).

Para o fármaco TA a seletividade e especificidade do método foram avaliadas a partir de análises de cromatogramas obtidos da extração das amostras de SO grupo controle (SO sem o fármaco), das amostras de humor aquoso do grupo controle e da formulação da suspensão injetável de TA. Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 25.

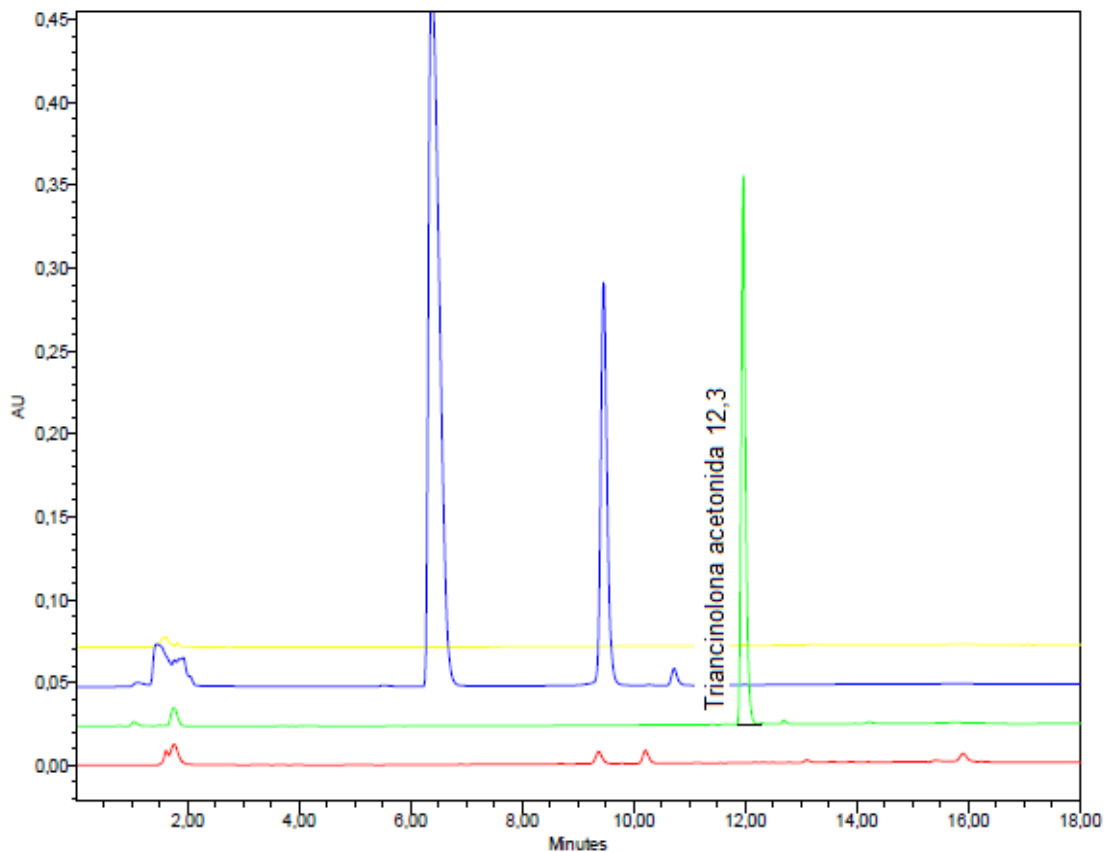


Figura 25 - Cromatograma do humor aquoso grupo controle (amarelo). Cromatograma da formulação da suspensão injetável de TA (azul). Cromatograma do padrão do fármaco TA (verde). Cromatograma da extração do SO do grupo controle (SO sem o fármaco) (vermelho).

Após análise dos cromatogramas não se observou interferentes no tempo de retenção tanto do fármaco DA quanto do fármaco TA, concluindo que os métodos são específicos e seletivos para análise do fármaco DA e TA nos estudos *in vivo*.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi estabelecido pela injeção de soluções contendo o fármaco DA e soluções contendo o fármaco TA, em concentrações decrescentes até se encontrar a menor concentração em que o método detectava o fármaco. A menor concentração em que o pico de eluição do fármaco DA apresentou boa aparência foi de 0,1 µg/mL. Este dado permite concluir que o limite de detecção do método foi de 0,1 µg/mL. Para o fármaco TA, a menor concentração em que o pico de eluição do fármaco apresentou boa aparência foi de 0,2 µg/mL, sendo este o limite de detecção.

O limite de quantificação encontrado para os métodos foram aqueles em que a menor quantidade do analito em questão pode ser quantificada com precisão e exatidão. A menor concentração do fármaco DA em solução que apresentou um pico de eluição com tais características foi a de 0,5 µg/mL e para o fármaco TA foi de 1 µg/mL.

Estabilidade

Por meio do estudo de estabilidade, verificou-se que a recuperação do fármaco DA foi de 105 % e do fármaco TA foi de 102 %. Assim a estabilidade dos fármacos em SO foi considerada satisfatória, visto que não houve diferença estatisticamente significativa entre a recuperação dos fármacos após 72 horas e 48 horas e uma vez que não foram visualizados produtos de degradação dos fármacos nas amostras de SO.

Pode-se concluir a partir destes resultados, que a validação dos métodos desenvolvidos comprovou a validade dos parâmetros e a possibilidade de sua aplicação para quantificação do fármaco DA e TA no estudo *in vivo*. Os Quadros 3 e 4 sintetizam os dados da validação obtidos nesta etapa do trabalho, para os fármacos DA e TA, respectivamente.

Quadro 3 – Dados da validação obtidos para o fármaco DA.

Método específico e seletivo	Sim
Linearidade	$r^2 > 0,99$
Exatidão	99,7% a 101,2%
Precisão	DPR < 5%
Limite de quantificação	0,5 µg/mL
Limite de detecção	0,1 µg/mL
Estabilidade	Adequada

Quadro 4 – Dados da validação obtidos para o fármaco TA.

Método específico e seletivo	Sim
Linearidade	$r^2 > 0,99$
Exatidão	97,9% a 105,1%
Precisão	DPR < 5%
Limite de quantificação	1,0 µg/mL
Limite de detecção	0,2 µg/mL
Estabilidade	Adequada

6.2 Desenvolvimento do método de extração dos fármacos DA e TA em SO

6.2.1 Dispersão dos fármacos DA e TA em SO

Os fármacos DA e TA são insolúveis em SO, assim, para o desenvolvimento do método de extração, era importante desenvolver um método para dispersar os fármacos em SO. Spitzer e colaboradores (2009) desenvolveram um método que

permite a dispersão da TA no SO, no entanto, a realização do método desenvolvido demandava grande quantidade de SO (4 mL), além de um prolongado tempo para sua execução (3 dias). Assim, foi avaliado durante esta etapa do trabalho, um método alternativo. Este se baseou na solubilização dos fármacos em SO o qual foi solubilizado em acetato de etila, solvente escolhido devido à sua baixa toxicidade quando comparado com as substâncias orgânicas também capazes de solubilizar o SO, como o tolueno e o benzeno. Para solubilizar o fármaco DA foi escolhido o solvente acetonitrila e para o fármaco TA o metanol. Em seguida as soluções com o fármaco e com o SO foram misturadas.

6.2.2 Seleção do solvente para extração do fármaco DA e TA

Para a extração do fármaco DA e TA, foram selecionados solventes que não solubilizam o SO (acetonitrila, metanol e água), mas que solubilizam mesmo que moderadamente os fármacos. Os resultados obtidos da extração do fármaco DA e TA pelos diferentes solventes, encontram-se na Tabela 15 e 16 e na Figura 26 e 27, respectivamente.

Tabela 15 - Porcentagem da recuperação do fármaco DA em SO, média, desvio padrão e DPR das extrações com os solventes acetonitrila, metanol e água.

	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Média	Desvio Padrão	DPR
ACN	105,3	106,3	108,8	107,0	1,8	1,6
MeOH	106,3	101,6	97,9	101,9	4,2	4,1
H₂O	56,7	56,2	56,7	56,5	0,5	0,9

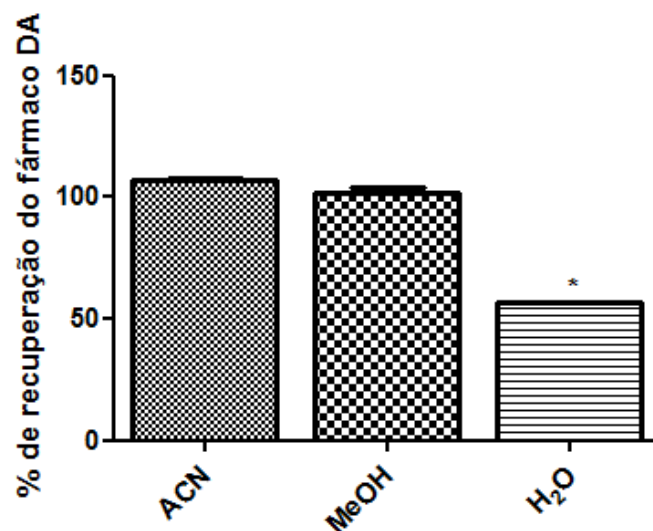


Figura 26 - Porcentagem de recuperação do fármaco DA em SO com os solventes acetonitrila, metanol e água. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3 para cada extração) * P < 0,0001 (teste de Tukey's).

Tabela 16 - Porcentagem da recuperação do fármaco TA em SO, média, desvio padrão e DPR das extrações com os solventes acetonitrila, metanol e água.

	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Média	Desvio Padrão	DPR
ACN	76,5	77,0	76,7	76,7	0,2	0,27
MeOH	93,3	93,8	90,0	92,4	1,7	1,82
H ₂ O	51,8	52,0	40,4	48,1	5,4	11,3

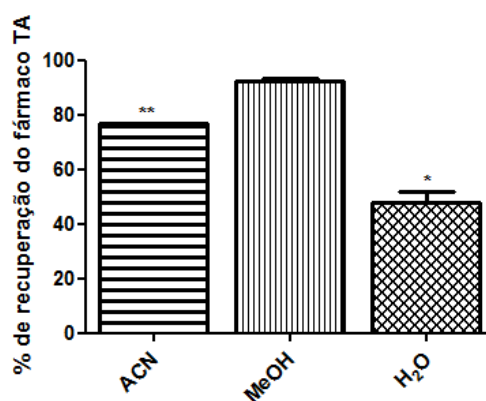


Figura 27 - Porcentagem de recuperação do fármaco TA em SO com os solventes acetonitrila, metanol e água. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3 para cada extração)* P < 0,0001 (teste de Tukey's).

As análises dos resultados mostraram que existe uma diferença estatisticamente significativa na extração dos fármacos com os diferentes solventes. Em relação ao fármaco DA, a água foi o solvente que proporcionou a menor recuperação do fármaco. Já entre a acetonitrila e o metanol não houve uma diferença estatisticamente significativa que diferenciasse os dois solventes. Portanto, foi escolhido a acetonitrila, visto que no método de dosagem por CLAE o pico do fármaco solubilizado em acetonitrila apresenta uma melhor simetria quando comparado com o metanol e a fase móvel usada para eluir este fármaco é acetonitrila e água.

Para o fármaco TA, a água também foi a que resultou em uma menor recuperação do fármaco, enquanto que em relação ao metanol e acetonitrila houve uma diferença estatisticamente significativa o que determinou a escolha do metanol como o solvente de extração.

6.2.3 Seleção da quantidade de solvente e do tempo ideal para extração dos fármacos DA e TA

Após decidir o solvente adequado para a extração, foi determinada a melhor quantidade de solvente necessário para a extração dos fármacos DA e TA em SO. Os resultados obtidos estão representados na Figura 28 e 29, respectivamente.

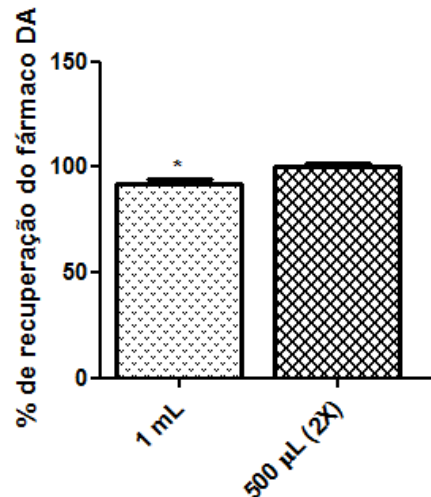


Figura 28 – Porcentagem de recuperação do fármaco DA com 1 mL e com duas porções de 500 µL do solvente acetonitrila. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3 para cada extração) *P < 0,05 (teste *t student*).

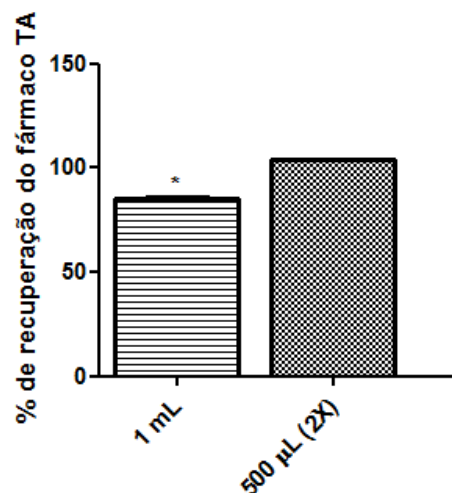


Figura 29 – Porcentagem de recuperação do fármaco TA com 1 mL e com duas porções de 500 µL do solvente acetonitrila. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3 para cada extração) *P < 0,05 (teste *t student*).

Após a análise dos resultados percebe-se que tanto para o fármaco DA quanto para o fármaco TA, existe uma diferença estatisticamente significativa entre a extração com 1 mL e a extração com duas porções de 500 µL de solvente. A extração com duas porções de 500 µL resultou em uma maior recuperação dos fármacos sendo assim a escolhida para extração destes. Esse resultado pode ser explicado, porque, quando o fármaco é extraído com duas porções de 500µL, este é exposto a uma maior superfície de contato do solvente, o que melhora o equilíbrio entre o fármaco e

o solvente e além disso, o maior tempo de extração influenciou este resultado, uma vez que foram duas extrações de cinco minutos.

Após definir a quantidade de solvente necessária para extração dos fármacos, foi verificada a influência do tempo na extração destes. A Figura 30 e 31 representa os resultados obtidos para o fármaco DA e TA.

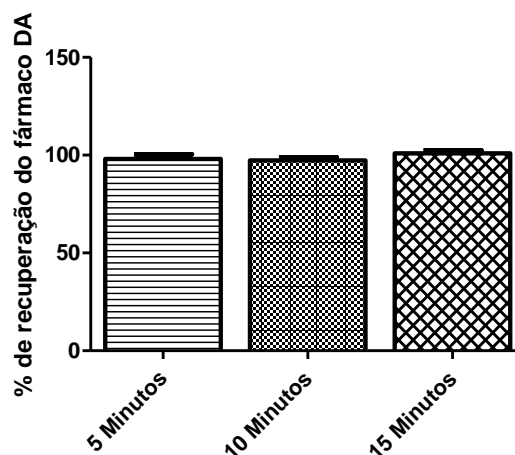


Figura 30 - Porcentagem de recuperação do fármaco DA no tempo de 5, 10 e 15 minutos. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$ para cada extração) $P > 0,05$ (teste de Tukey's).

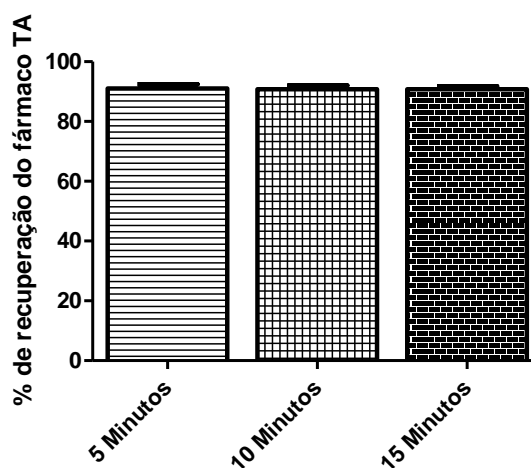


Figura 31 - Porcentagem de recuperação do fármaco TA no tempo de 5, 10 e 15 minutos. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$ para cada extração) $P > 0,05$ (teste de Tukey's).

De acordo com os resultados acima, não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos de extração: 5, 10, 15 minutos para os fármacos DA e TA. Portanto, foi escolhido o tempo de 5 minutos para extração dos fármacos em SO, uma vez que representa o menor tempo para a extração.

As metodologias de extração e quantificação desenvolvidas e validadas nos itens anteriores foram utilizadas para determinar a quantidade dos fármacos TA e DA presente no SO no estudo *in vivo*, conforme será abordado nos itens 6.3 e 6.4.

6.3 Determinação da quantidade do fármaco TA presente no SO e no humor aquoso a partir da injeção intravítrea

Blumenkranz e colaboradores em 1984 determinaram que a concentração de TA requerida para inibir o crescimento dos fibroblastos em 50% é 15 µg/ 100 µL. Assim, segundo Beer e colaboradores (2003) o efeito do fármaco TA duraria por até cinco meses, mas na prática a TA é encontrada no humor vítreo por até três meses após a injeção de 4mg. O Quadro 5 mostra o tempo de permanência do fármaco TA na cavidade vítrea, em diferentes doses em olhos não vitrectomizados.

Quadro 5 – Tempo de permanência do fármaco TA no humor vítreo ou no humor aquoso por diferentes autores em olhos não vitrectomizados.

Quantidade do fármaco TA administrado em uma injeção intravítrea	Presença do fármaco TA em olhos não vitrectomizados	Referência
0,3 mg	Trinta dias (coelhos, análise no humor vítreo)	Hee-Seung (2005)
0,5 mg	Quarenta e um dias (coelhos, análise no humor vítreo)	Schindler (1982)
4 mg	Três meses (humanos, análise humor aquoso)	Beer (2003)
6 mg	Oito meses (coelhos, análise humor vítreo)	Kampmeter (2008)
25 mg	Doze meses (Humanos, análise humor vítreo)	Jonas (2003)

O tempo de permanência do fármaco TA depende da quantidade administrada inicialmente, de forma que quanto maior a dose, maior o tempo do fármaco na cavidade vítrea.

A determinação da quantidade do fármaco TA presente em SO nos olhos vitrectomizados, foi realizada por CLAE de acordo com o método desenvolvido e validado neste trabalho. A concentração do fármaco TA encontrada após extração em SO está representado na Figura 32.

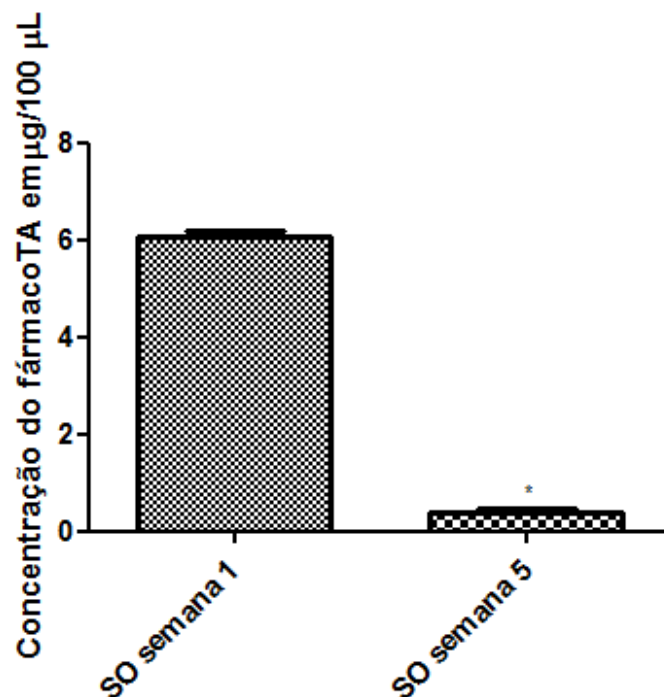


Figura 32 – Concentração do fármaco TA em µg/100 µL, após semanas 1 e 5, presente no SO. Dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3 para cada semana)
*P < 0,05 (teste *t student*).

O gráfico apresentado na Figura 32 mostra o perfil de eliminação do fármaco TA da cavidade vítrea em olhos vitrectomizados. Pode-se observar que uma semana após a injeção do fármaco, na concentração de 4 mg/ 100 µL, a concentração decai para aproximadamente 6 µg/100 µL e após cinco semanas, para aproximadamente 0,5 µg/ 100 µL.

O cálculo da meia-vida foi realizado a partir da quantidade de TA eliminada da cavidade vítrea. Portanto, a meia-vida do fármaco TA, determinado a partir de sua quantificação em SO, em olhos vitrectomizados é de aproximadamente 3,5 dias. Oliveira e colaboradores em 2012 determinaram que a meia vida do fármaco TA, na concentração de 4mg, era de $8 \pm 2,8$ dias em olhos não vitrectomizados.

O fármaco é então, eliminado 2,3 vezes mais rapidamente em olhos vitrectomizados, do que em olhos não vitrectomizados e a concentração requerida para inibir o crescimento dos fibroblastos, segundo Blumenkranz e colaboradores (1984), não é encontrada após uma semana da injeção.

Ahmadeih e colaboradores (2008) realizaram um estudo para avaliar a propriedade antiproliferativa da TA após uma única injeção de 4 mg em olhos vitrectomizados. Os autores reportaram que os olhos submetidos à cirurgia de vitrectomia com injeção de TA, não tiveram nenhum efeito benéfico no “recolamento” da retina e na diminuição da incidência de PVR, quando comparado com os olhos controles. O resultado deste trabalho, sugere que o motivo de não se encontrar efeito benéfico da TA frente aos olhos controles, pode ser a posologia utilizada de 4 mg.

A concentração de 4 mg/ 100 μ L pode não ser o suficiente para tratar reproliferação de tecido fibroso após cirurgia de vitrectomia, uma vez que a eliminação do fármaco é aumentada. Assim, acredita-se que uma maior frequência de injeções em um curto período de tempo, seja necessário, ou então, o aumento da dose de TA administrada inicialmente. O aumento da frequência das injeções intravítreas poderia causar problemas já discutidos anteriormente, como descolamento da retina, catarata e endoftalmite, enquanto que o aumento da dose poderia causar problemas relacionados com a toxicidade do fármaco ou com o aumento da pressão intraocular.

Para avaliar o perfil de eliminação do fármaco via segmento anterior foi determinada a concentração de TA presente no humor aquoso em olhos vitrectomizados. Esta etapa do trabalho objetivou avaliar por qual segmento, anterior ou posterior, ocorre uma maior eliminação do fármaco TA.

A concentração do fármaco TA no humor aquoso após uma única injeção intravítrea está representada na Figura 33.

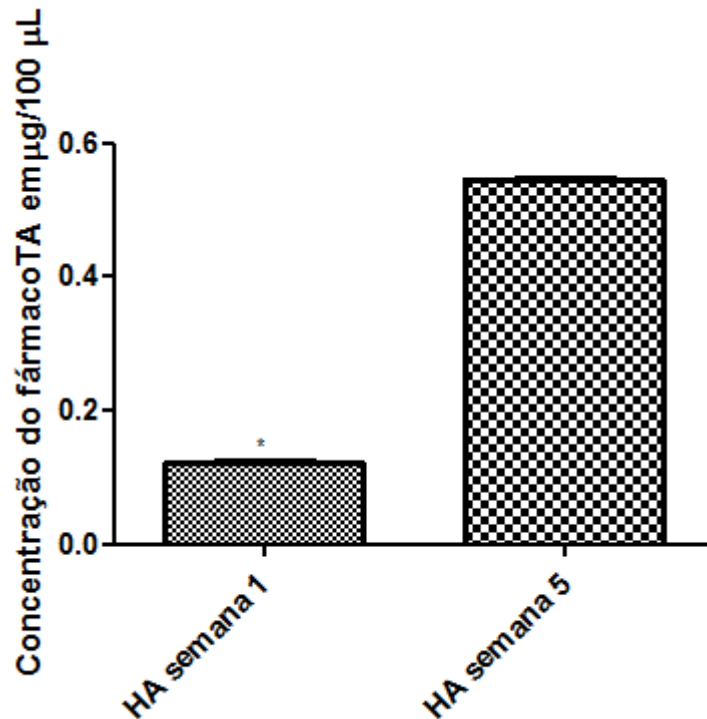


Figura 33 – Concentração do fármaco TA em $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, após semanas 1 e 5, presentes no humor aquoso (HA). Dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$ para cada semana) * $P < 0,05$ (teste *t student*).

Beer e colaboradores (2003) mostraram que em olhos não vitrectomizados, dez dias após uma única injeção de 4 mg de TA, encontram-se $0,083 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ do fármaco TA no humor aquoso. Entretanto, as concentrações encontradas do fármaco no humor aquoso após sete dias no presente trabalho, foram aproximadamente $0,2 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$. Assim, o fármaco TA foi encontrado no humor aquoso em uma quantidade cerca de 2,4 vezes maior quando comparado com olhos não vitrectomizados.

O motivo pelo qual foi encontrado mais fármaco no segmento anterior e o motivo pelo qual ocorreu um aumento de sua eliminação pode estar relacionado com o SO. O fármaco TA é uma substância lipofílica que quando presente em SO permanece na sua forma não ionizada. Os fármacos lipofílicos são eliminados mais facilmente

pela retina e pela coróide. Como o SO é menos viscoso que o humor vítreo, sugere-se que o aumento da circulação da TA na cavidade vítrea, aumentou a sua difusão para a o segmento anterior do olho. Além disso, o fármaco TA não possui afinidade pela matriz de SO o que é uma importante característica para explicar o aumento da sua eliminação da cavidade vítrea. A Figura 33 também mostra um aumento significativo da concentração do fármaco no humor aquoso, o que sugere que a eliminação do fármaco ocorre em maior parte através da retina, ou seja, segmento posterior. Foi proposto, por meio da Figura 34, a distribuição e a eliminação do fármaco TA. A figura mostra que ocorre uma maior eliminação da TA pelo segmento posterior do que sua distribuição para o segmento anterior. Assim o fármaco é eliminado preferencialmente pelo segmento posterior do que pelo anterior.

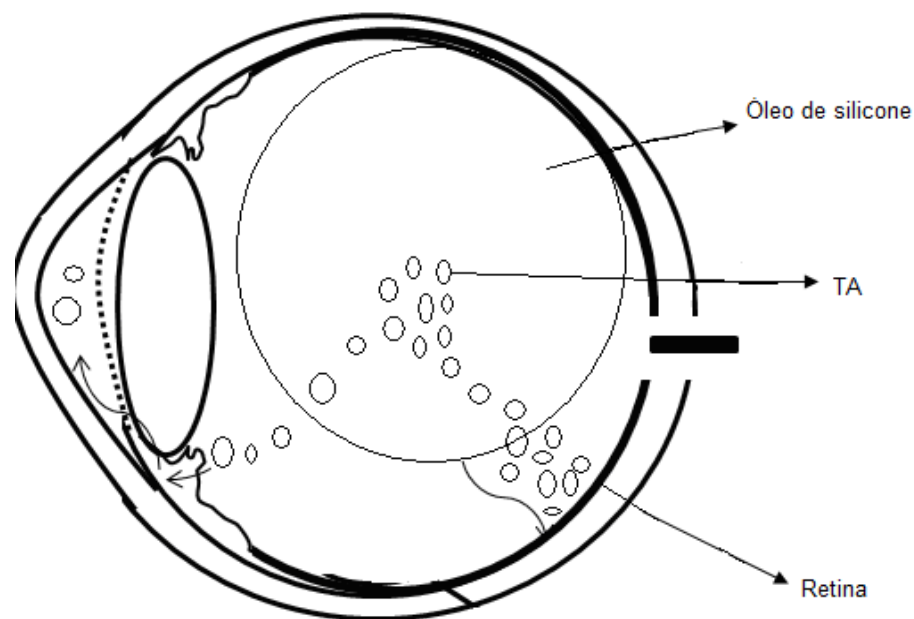


Figura 34 - Eliminação e distribuição do fármaco TA na cavidade vítrea.

Apesar de o fármaco ser eliminado mais rapidamente em olhos vitrectomizados, estudos farmacológicos mais aprofundados são necessários para determinar se a concentração de 4 mg/100 μ L realmente não seria suficiente para tratar complicações relacionadas com a cirurgia de vitrectomia.

6.4 Determinação da quantidade do fármaco DA presente no SO e no humor aquoso a partir do implante de PLGA

O primeiro esteróide que foi administrado por meio de injeções intravítreas foi a dexametasona, durante a década de 70 (Graham e Peyman, 1974). No entanto, as propriedades físico-químicas da dexametasona, conferem a ela uma meia-vida muito curta o que leva a uma rápida eliminação do fármaco da cavidade vítrea. Porém, a dexametasona é um dos mais potentes antiinflamatórios esteróides, o que levou ao desenvolvimento de implantes intraoculares para liberar o fármaco por um período prolongado. Como já foi discutido no item 2.4.2.2, a dexametasona é usada em diversas doenças vitreoretinianas, como por exemplo, em casos de vitreorretinopatia com objetivo de reduzir o crescimento fibrovascular.

Não se encontra descrito na literatura o perfil de eliminação de implantes de DA após cirurgia de vitrectomia em que o humor vítreo foi substituído por SO. Como os implantes intraoculares foram desenvolvidos para liberar o fármaco por um tempo prolongado na cavidade vítrea, esta propriedade pode ser fundamental para tratar as complicações após cirurgia de vitrectomia.

Frente ao exposto, esta parte do trabalho avalia o perfil de eliminação do fármaco DA administrado por meio de implantes intraoculares em olhos vitrectomizados, comparando com a administração deste implante em olhos não vitrectomizados. O objetivo desta avaliação foi propor uma alternativa clínica para o tratamento das complicações da cirurgia de vitrectomia.

Fialho, em 2006, realizou um estudo *in vivo*, em que se administrou implantes de PLGA contendo o fármaco DA em olhos não vitrectomizados. Foi observado um estágio inicial de liberação lenta do fármaco e em seguida um pico de liberação após quatro semanas e 60% do fármaco foi liberado em aproximadamente seis semanas. Ainda segundo Fialho, após seis semanas não foi possível avaliar a quantidade de fármaco restante nos implantes, uma vez que os sistemas se apresentavam bastante degradados. A degradação do PLGA no humor vítreo ocorre pela hidrólise de suas ligações ester.

No presente trabalho não foram encontrados nem o fármaco e nem o implante após as semanas 4, 8 e 9 nos animais estudados. A análise deste resultado sugere que o implante foi totalmente degradado em menos de 4 semanas. Assim, é possível supor que o implante ficou posicionado entre a retina e o óleo de silicone. Dessa forma, a água proveniente do tecido retiniano hidrolisou o implante e o fármaco foi liberado rapidamente. A Figura 35 esquematiza a proposta sugerida.

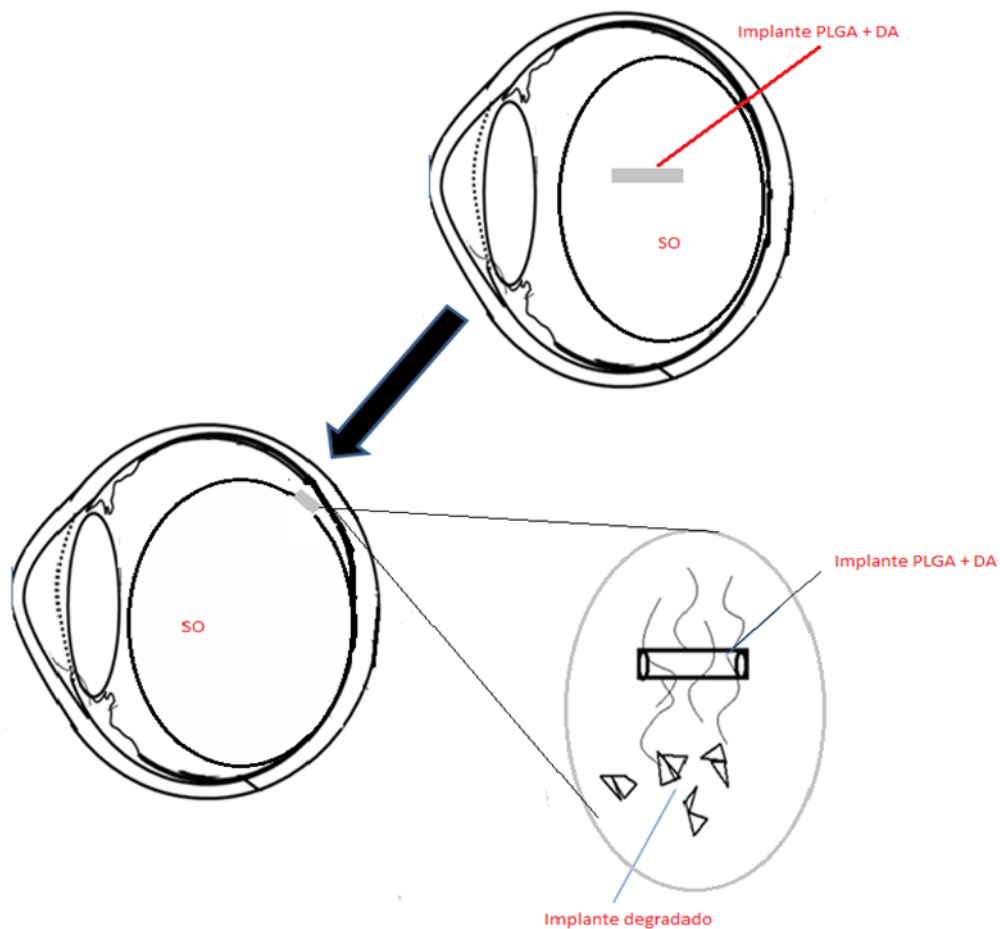


Figura 35 – Esquema da degradação do implante.

Adicionalmente, estes resultados estão de acordo com o trabalho publicado por Morita e colaboradores (1998). Estes autores mostraram que a liberação do fármaco flucinolona a partir de implantes de PLA em olhos vitrectomizados é 2,5 vezes mais rápido do que em olhos não vitrectomizados.

Para que o fármaco fosse eliminado da cavidade vítrea ele foi primeiro liberado do implante. A propriedade que determina a velocidade de degradação do polímero PLGA é a proporção entre seus monômeros PLA e PGA. Quanto maior a proporção de PLA, mais lentamente o fármaco será liberado do sistema, uma vez que o PLA, por possuir um grupo metila na sua estrutura é mais hidrofóbico que o PGA.

Pode-se dizer diante do que foi discutido acima, que, para o implante de DA ser uma alternativa clínica para o tratamento de complicações após cirurgia de vitrectomia, deve-se avaliar a quantidade ideal de fármaco administrada nos implantes e o tipo de polímero a ser utilizado.

Frente a suposta aplicação das injeções intraoculares de TA e dos implantes a base de PLGA contendo DA na prevenção das complicações relacionadas ao uso do SO em olhos vitrectomizados, propusemos como última etapa deste trabalho, a avaliação do possível efeito neuroprotetor da TA e DA nas concentrações de 4 mg e 350 µg respectivamente, em SO.

6.5 Estudo Histológico

As alterações histopatológicas provocadas pelo SO podem ocorrer devido à ação tóxica direta na retina e à injúria mecânica gerada pela pressão do SO sobre a retina superior (Paques, 2006). Paques em 2006 constatou que a cetamina, cetoprofeno e lamotrigina protegeram a retina dos olhos de coelhos albinos submetidos à vitrectomia com injeção de óleo de silicone, podendo, portanto ser considerados agentes neuroprotetores da retina. Assim, o objetivo deste estudo histológico foi avaliar a proteção, contra as alterações provocadas pelo SO, proporcionada pelos fármacos DA e TA nas células da retina. A Figura 36 apresenta a densidade de células presentes na retina dos animais dos grupos 1, 2 e 3, analisadas após quatro semanas de estudo.

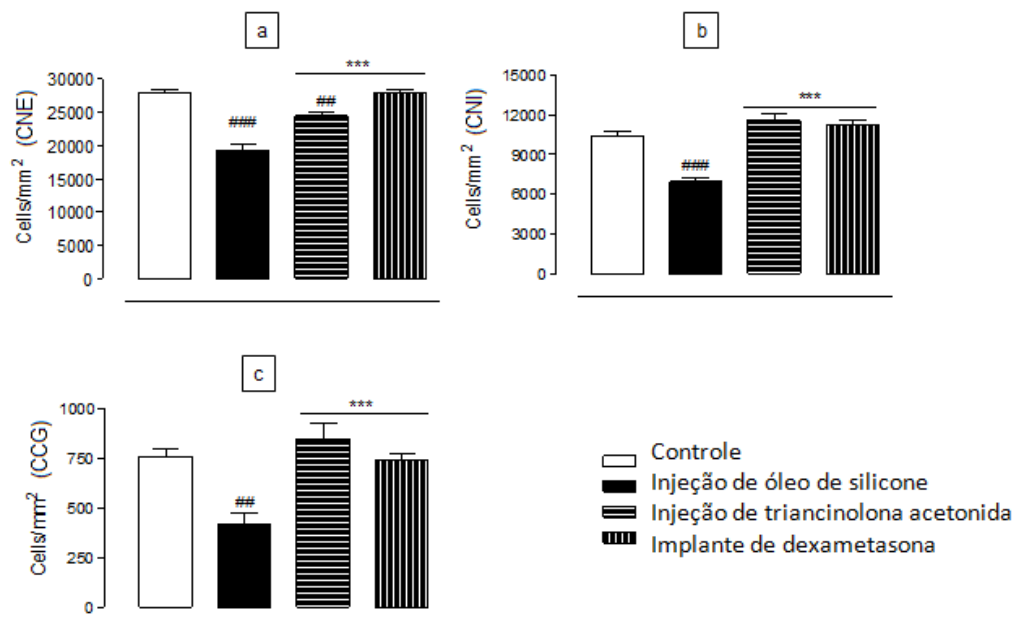


Figura 36 – Densidade de células dos diferentes grupos estudados: camada nuclear externa da retina (a), camada nuclear interna da retina (b), camada de células ganglionares da retina (c). Dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

$P < 0,001$ e ## $p < 0,01$, diferenças significativas quando comparadas com o controle. *** $P < 0,001$, diferença significativa quando comparado com o a injeção de óleo de silicone.

Analisando a Figura 36, observa-se que o grupo 1, que foi submetido à vitrectomia e que recebeu apenas a injeção de SO, apresentou baixa densidade de células por mm^2 , nas camadas nuclear externa, interna e ganglionar da retina, quando comparado com o grupo controle. Este resultado mostra que a vitrectomia com injeção apenas de SO causa afinamento das camadas da retina, devido à morte celular, o que pode levar à uma deterioração visual progressiva.

Entretanto, quando foi administrada uma injeção intravítrea de TA, após a cirurgia de vitrectomia em que o humor vítreo foi substituído por SO, observou-se que não houve diferença entre a densidade de células do grupo controle e do grupo que recebeu o fármaco TA, mostrando que este fármaco impede o afinamento das camadas da retina, ou seja, diminui a morte celular.

Para avaliar se o fármaco DA também apresenta este efeito, foi analisada a retina dos olhos dos animais do grupo 2. Observou-se que, assim como a TA, o uso do

fármaco DA também não apresentou diferença de densidade de células quando comparado com o grupo controle.

A análise deste resultado mostra que quando se avalia as alterações provocadas pelo SO, tanto o implante contendo DA quanto as injeções de TA são eficazes em proteger a retina.

Foi mostrado no item 6.3 que a meia-vida do fármaco TA diminui aproximadamente 2,3 vezes, em olho vitrectomizados. Mesmo diante dessa maior eliminação do fármaco, o resultado do estudo histológico mostra que o efeito benéfico perdura mesmo após o fármaco ter sido eliminado em sua maior parte. O mesmo acontece com o fármaco DA. No item 6.4 foi mostrado que o fármaco é eliminado em menos de quatro semanas de estudo. Assim, o resultado encontrado neste item sugere que o efeito do fármaco não está totalmente relacionado com a sua velocidade de eliminação.

Sabe-se que os danos provocados pelo SO são diferentes dos problemas relacionados com a cirurgia de vitrectomia. Portanto, cabe avaliar por meio de outros estudos se as quantidades dos fármacos usadas neste trabalho são suficientes para tratar complicações relacionadas com a neovascularização e inflamação, que são condições presentes após cirurgia de vitrectomia. Pois, a concentração mínima requerida para evitar estes problemas pode ser diferente da concentração mínima requerida para diminuir a morte celular.

Em resumo, a parte experimental deste trabalho permitiu: 1) validar as metodologias adotadas para quantificação dos fármacos TA e DA presente no SO, 2) extrair os fármacos de forma eficaz das matrizes composta pelo SO e humor aquoso, 3) determinar o perfil de eliminação do fármaco TA da cavidade vítrea 4) observar o efeito neuroprotetor da TA e DA em olhos vitrectomizados.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o implante a base de PLGA contendo DA pode vir a ser uma alternativa para minimizar as complicações relacionadas ao SO em olhos vitrectomizados. No entanto, uma vez que a

eliminação deste fármaco da cavidade vítrea é acentuada, são necessários futuros estudos que avaliem doses maiores deste fármaco e polímeros diferentes do PLGA.

Em adição, o trabalho mostrou a possibilidade de quantificação dos fármacos TA e DA presentes em SO pelo método analítico CLAE, o que é uma importante contribuição uma vez que, os trabalhos na literatura descrevem apenas métodos indiretos, empregando a avaliação do humor aquoso para quantificar os fármacos presentes em olhos vitrectomizados.

7 CONCLUSÕES

Nosso estudo permitiu avaliar o perfil de eliminação e confirmar a neuroproteção dos fármacos TA, administrados por meio de injeções intravítreas, e DA, administrado por meio de implantes biodegradáveis, em olhos vitrectomizados em que o humor vítreo foi substituído por óleo de silicone.

A avaliação do perfil de eliminação realizada neste trabalho é de extrema importância uma vez que a vitrectomia é uma realidade no país e, portanto, é necessário saber o que ocorre com os fármacos administrados nos olhos de pacientes vitrectomizados na presença de SO.

Como perspectiva pretende-se avaliar quais as doses ideais do fármaco DA e TA a serem administradas em pessoas submetidas a cirurgia de vitrectomia, bem como avaliar o polímero ideal a ser utilizado.

REFERÊNCIAS

AABERG, T. M. Pars plana vitrectomy for diabetic traction retinal detachment. *Ophthalmology*, v.88, p.639–642, 1981.

AABERG, T. M.; ABRAMS, G. W. Changing indications and techniques for vitrectomy in management of complications of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, v.94, p.775–779, 1987.

ACAR, N. et al. Pars plana vitrectomy with and without triamcinolone acetonide assistance in pseudophakic retinal detachment complicated with proliferative vitreoretinopathy. *Japanese Journal of Ophthalmology*, v.54, p.331-337, 2010.

AHMADEIH, H. et al. Triamcinolone Acetonide in silicone-filled eyes as adjunctive treatment for proliferative vitreoretinopathy. *Journal of Ophthalmology*, v.11, n.115, p.1938-1943, 2008.

ALDER, V. A. et al. Diabetic retinopathy: early functional changes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.24, p.9-10, 1997.

BALI, E. et al. The effect of a preoperative subconjunctival injection of dexamethasone on blood-retinal barrier breakdown following scleral buckling retinal detachment surgery: a prospective randomized placebo-controlled double blind clinical trial. *Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v.248, p.957-962, 2010.

BARTLETT, J. D. *Clinical Ocular Pharmacology*. (1995) 1057 f. Woburn, Massachusetts, EUA, 1995.

BEER P. M. et al. Intraocular concentration and pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after a single intravitreal injection. *Ophthalmology*, v.4, n.110, p.681-686, 2003.

BLUMENKRANZ M. S. Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease: cell culture evaluation. *Archives of Ophthalmology*, v.102, p.598–604, 1984.

BOSCO, A. et al. Retinopatia Diabética. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.49, n.2, p.217-227, 2005.

BRADLEY, J. et al. Combination therapy for the treatment of ocular neovascularization. *Angiogenesis*, v.10, n.2, p.141-148, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, 29 de maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2003.

BRESNICK, G. H.; MYERS F. L. Vitrectomy surgery for diabetic retinopathy. *Annual Review of Medicine*, v.30, p.331-338, 1979.

CASTELLARIN A. et al. Vitrectomy with silicone oil infusion in severe diabetic retinopathy. *British Journal Ophthalmology*, v.87, p.318-321, 2003.

CHAN T. K, et al. Visual recovery following treatment with very high dose corticosteroid in traumatic optic neuropathy. *Singapore Medical Journal*, v.37, p.216–217, 1996.

CHEN, J. C. Sutureless pars plana vitrectomy through self-sealing sclerotomies. *Archives of Ophthalmology*, v.114, p.1273–1275, 1996.

CHRISTOFORIDIS, J. et al. The effect of intravitreal anti-VEGF agents on peripheral wound healing in a rabbit model. *Clinical ophthalmology*, v.6, p.61-69, 2012.

CIBIS P. et al. The use of liquid silicone in retinal detachment surgery. *Archives of Ophthalmology*, v.68, p.590-599, 1962.

COULT, S. M.; BAKRI, S. J. Use of triamcinolone during vitrectomy surgery to visualize membranes e vitreous. *Clinical ophthalmology*, v.4, n.2, p.891-896, 2008.

DAMICO, F. M. Angiogênese e doenças da retina. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.3, n.70, p.547-553, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L221/8.

EUROPEAN PHARMACOPEIA, 5 ed, Strasbourg: Council of Europe, p. 1665, 2004.

FELT-BAEYENS O. et al. Biodegradable scleral implants as new triamcinolona acetonide delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v.322, p.6-12, 2006.

FIALHO, S. L. et al. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.66, p.891-896, 2003.

FIALHO, S. L. *Desenvolvimento de implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular de corticóides*. (2006). 144 f. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. S. Sistema de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.1, n.70, p.173-179, 2007.

FUGII, G. Y. et al. Initial experience using the transconjunctival sutureless vitrectomy system for vitreoretinal surgery. *Ophthalmology*, v.109, n.10, p. 1814-1820, 2002.

GOMES, E. C. L. *Desenvolvimento e avaliação da viabilidade de implantes intraoculares constituídos de poliuretano biodegradável e bevacizumabe*. (2011). 83 f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

GOODMAN, L. S. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11 ed. (2006) 1436 f. Rio de Janeiro, 2006.

GOROVITS, R. et al. Glutamine syntetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue. *The National Academy of Sciences*, v. 94, p.7024-7029, 1997.

GRAHAM, R. O; PEYMAN, G. A. Intravitreal injection of dexamethasone: treatment of experimentally induced endophthalmitis. *Archives of Ophthalmology*, v.92, p.149-154, 1974.

HAGEMANN, L. F. et al. Indicações de cirurgia vitreoretiniana sem sutura introdução. *Retina e Vítreo*, 2006.

HARMONY TOTAL TTC[®]. Estados Unidos da América, 2012. Disponível em <http://www.dorc.nl/literature/harmony_total.pdf>. Acesso em 20 de janeiro, 2012.

HAUT J. et al. Utilisation du silicone intraoculaire apres vitrectomie comme traitement des retractions massive du vitre. *Bull Soc ophthalmol*, v.78, n.361, 1978.

HEE-SEUNG et al. Difference in clearance of intravitreal triamcinolone acetonide between vitrectomized and nonvitrectomized eyes. *Retina, the Journal of retinal and vitreous disease*, v.5, n.25, p.556-560, 2005.

HERRERO-VANRELL, R. et al. Clinical applications of the sustained-release dexamethasone implant for treatment of macular edema. *Clinical ophthalmology*, v.5, p.139-146, 2011.

JONAS, J. B. et al. Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative vitreoretinopathy. *British Journal Ophthalmology*, v.84, p.1064-1071, 2000.

JONAS, J. B. Intraocular availability of triamcinolone acetonide after intravitreal injection. *American Journal of Ophthalmology* v.137, p.560-562, 2003.

JONAS, J. B. Intravitreal triamcinolone acetonide for treatment of intraocular edematous and neovascular diseases. *Acta Ophthalmologica*, v.83, p.645-663, 2005.

KAMPPTER B. A. et al. Intraocular concentration of triamcinolone acetonide after intravitreal injection in the rabbit eye. *Journal of Ophthalmology*, v.19, n.1, p.1372-1375, 2008.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica*, v.215, p.143-155, 2001.

KONSTANTOPOULUS A. et al. Outcome of intravitreal triamcinolone acetonide in postoperative cystoid macular oedema. *Eye*, v.22, p.219-222, 2008.

LEE S. Y. et al. Intravitreal triamcinolone acetonide i eyes with recurrent postvitrectomy diabetic vitreous hemorrhage. *American Journal of Ophthalmology*, v.3, n.142, p.501-503, 2006.

LEE S. Y. et al. Efficacy of intravitreal triamcinolone acetonide for eyes with postvitrectomy diabetic vitreous hemorrhage. *Korean journal of ophthalmology*, v.21, n.4, p.208-212, 2007.

LIU, X. et al. Ocular pharmacokinetic study of a corticosteroid by 19F MR. *Experimental eye research*, v.91, p.347-352, 2010.

LLOYD, A. W. et al. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials*, v.22, n.8, p. 769-785, 2001.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, v.23, n.2, 2006.

MELLO FILHO P. A. A. et al. Farmacologia aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.3, n.73, p.294-299, 2010.

MENDES, T. S. et al. Triancinolona: adjuvante na cirurgia de descolamento da retina com proliferação vitreoretiniana. *Retina & Vítreo*, v.23, 2010.

MENDONÇA, R. H. F. et al. Qualidade de vida em pacientes com retinopatia diabética proliferativa. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.4, n.27, p.178-183, 2008.

MORITA Y, SAINO H, TOJO K. Polymer blend implant for ocular delivery of fluorometholone. *Biology Pharmaceutical Bull*, v.21, p.72-75, 1998.

MUNIR W. M.; et al. Intravitreal triamcinolone for treatment of complicated proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Canadian Journal of Ophthalmology*, v.40, p.598–604, 2005.

OLIVEIRA, L. B. et al. Vitrectomia farmacológica e descolamento do vítreo posterior. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.67, n.4, p.973-976, 2004.

OLIVEIRA, R. C. *Estudo comparativo da farmacocinética vítrea e toxicidade retiniana entre o acetonido de triancinolona com e sem preservativo álcool benzílico, em olhos de coelhos*. (2008) 74 f. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

OLIVEIRA, R. C. et al. Vitreous pharmacokinetics and retinal safety of intravitreal preserved versus non-preserved triamcinolone acetonide in Rabbit Eyes, v.37, p.55-61, 2012.

ORÉFICE, F. *Uveíte: clínica e cirúrgica*. (2005). 1536 f. Cultura médica, 2.Ed. Rio de Janeiro 2005.

PAQUES, M. W. *Neuroproteção da retina dos olhos de coelhos albinos (raça Nova Zelândia) submetidos à vitrectomia com substituição do vítreo por óleo de silicone*. (2006). 162 f. Tese de doutorado, Departamento de oftalmologia, otorrinolaringologia e cirurgia de cabeça e pescoço, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PEYMAN, G. A.; CHEEMA, R.; CONWAY, F. T. Triamcinolone acetone as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloids during *pars plana* vitrectomy. *Retina*, v.20, p.554-555, 2000.

RATNER, M. Eylea approval transforms regeneron. *Nature biotechnology*, in press, 2012.

RICHTER, A. M et al. Preliminary studies on a more effective phototoxic agent than hematoporphyrin. *Journal Natl Cancer Institute*, v.79, p.1327-1332, 1987.

ROMANO M. R. et al. Intraocular pressure changes following the use of silicone oil or desiron 68 as endotamponade in *pars plana* vitrectomy. *Clinical Ophthalmology*, v.4, p.1391-1396, 2010.

ROTSOS, T. G.; MOSCHOS M. M. Cystoid macular edema. *Clinical Ophthalmology*, v.4, n.2, p.919-930, 2008.

SALIBA, J. B. *Sistemas biodegradáveis de administração intra-ocular contendo ciclosporina (A) para tratamento da uveíte posterior*. (2007) 118 f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SALIBA J. B. *Avaliação biológica de implantes biodegradáveis contendo ciclosporina (A) de administração intravítrea*. (2011). 152 f. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SAXENA, S.; GOPAL, L. Fluid vitreous substitutes in vitreo retinal surgery. *Current Ophthalmology*, v.4, p.191-206, 1996.

SAKAMOTO, T. et al. Triamcinolone –assisted pars plana vitrectomy improves the surgical procedures and decreases the postoperative blood-ocular barrier breakdown. *Experimental Ophthalmology*, v.240, p.423-429, 2002.

SATO H. et al. Efficacy of sub-tenon's capsule injection of triamcinolone acetonide for refractory diabetic macular edema after vitrectomy. *The Journal of Medical Investigation*, v.55, p.279-282, 2008.

SCHOLLES G. N. et al. Clearance of triamcinolone from vitreous. *Archivie of Ophthalmology*, v.13, p.1567-1569, 1985.

SCHWARTZ S. G.; FLYNN JR. F. W. Pharmacotherapies for diabetic retinopathy: present and future. *Experimental Diabetes Research*, v.10, p. 52487-52495, 2007.

SCHINDLER, R. H. et al. The clearance of intravitreal triamcinolone acetonide. *American Journal of Ophthalmology*, v.4, p.415-417, 1982.

SERRARBASSA, P. D.; DIAS, A. F. G.; VIEIRA, M. F. Novos conceitos em retinopatia diabética: dano neurológico versus dano vascular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.71, n.3, p.459-463, 2008.

SHAH, A. M. et al. Does laser still have a role in the management of retinal vascular and neovascular diseases? *Laser for Retinal Vascular and Neovascular*, v.3, 2011

SILVA G. R. et al. Implants as drug delivery devices for treatment of eye diseases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.3, n.46, p.585-595, 2010.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicação e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, v.25, n.5, 2002.

SIQUEIRA R. C. et al. Retinal detachment surgery with silicone oil injection in transconjunctival sutureless 23-gauge vitrectomy. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.6, n.70, p.905-909, 2007.

SIQUEIRA, R. C. et al. *Pars plana* vitrectomy and silicone oil tamponade for acute endophthalmitis treatment. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.1, n.72, p.28-32, 2009.

SMIDDY, W. F.; FLYNN, M. W. Vitrectomy in the management of diabetic retinopathy. *Survey of Ophthalmology*, v.6, n.43, p.491-501, 1999.

SOUZA, F. L. C. *Desenvolvimento de bases emulsionadas de silicone e água e avaliação comparativa com bases emulsionadas de óleo e água para uso externo de uso mais comum em manipulação.* (2007). 198f. Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SPITZER, M. S. et al. The distribution, release kinetics and biocompatibility of triamcinolone injected and dispersed in silicone oil. *Investigative ophthalmology & Visual Science*, v.5, n.50, p.2337-2343, 2009.

TAO, Y.; JONA, J. B. Intravitreal triamcinolone. *Ophthalmologica*, v.1,n.225, p.1-20, 2011.

TATAR O. et al. Early effects of intravitreal triamcinolone acetate on inflammation and proliferation in human choroidal neovascularization. *American Medical Association*, v.3, n.127, p.275-281, 2009.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA : USP 32: the National Formulary. Rockville, Md.: The United States Pharmacopeial Convention, 2005.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advance Drug Delivery Reviews*, v.58, p.1131-1135, 2006.

VALIATTI, F. B. et al. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia*, v.2, n.55, 2011.

ZAMPROS, L. et al. Anti-vascular endothelial growth factor agents for neovascular age-related macular degeneration. *Journal of ophthalmology*, in press, 2012.

ZHANG, L. et al. Pharmacokinetics and tolerance study of intravitreal injection of DEX-loaded nanoparticles in rabbits. *International Journal of Nanomedicine*, v.4, p.175-183, 2009.

WEINREB, R.; COTLIER, E. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, v.3, n.45, p.195-214, 2000.

WICKHAM L. J. et al. Immunopathology of intraocular silicone oil: retina and epiretinal membranes. *British journal of ophthalmology*, n.91, p.258-262, 2007.

WILKES, S. R. Current therapy of diabetic retinopathy: laser and vitreoretinal surgery. *Journal of the National Medical Association*, v.11, n.85, p.841-847, 1993.

YAKAMARI, K et al. Reduce incidence of intraoperative complications in a multicenter controlled clinical Trial of triamcinolone in vitrectomy. *Journal of Ophthalmology*, v.7, n.24, p.289-296, 2006.