

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

ANA ELISA REIS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA BIODEGRADÁVEL CONTENDO
BEVACIZUMABE PARA INIBIÇÃO DA NEOVASCULARIZAÇÃO DA
CÓRNEA**

BELO HORIZONTE – MG

2014

ANA ELISA REIS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA BIODEGRADÁVEL CONTENDO
BEVACIZUMABE PARA INIBIÇÃO DA NEOVASCULARIZAÇÃO DA
CÓRNEA**

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

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha júnior

Coorientadora:

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

BELO HORIZONTE – MG

2014

Dedico este trabalho ao Leonardo, meu marido e meu grande amor, pelo apoio e carinho incondicional em todos os momentos. Sem você nada disso seria possível.

A minha mãe que sempre acreditou em mim, pelo apoio, encorajamento e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e me mostrar os melhores caminhos.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior pela confiança no meu trabalho, incentivo, amizade e pelas oportunidades.

À doutora Sílvia Ligório Fialho pela orientação, apoio, incentivo, amizade e por ter me dado a oportunidade de realizar esse sonho.

À minha mãe Geci pelo apoio, pelas orações e por acreditar em mim. A minha irmã Patrícia pela amizade. Ao meu marido Leonardo pelas conversas e pela força em todos os momentos.

À doutora Luciana Maria Silva pelos ensinamentos valiosos, conselhos, pela amizade e por sempre estar disposta a me ajudar.

À Eliane Ayres por estar sempre disponível a me ajudar, discutir, me ensinar e também pela colaboração e ajuda na síntese do polímero utilizado neste trabalho, muito obrigada por tudo. Ao Rodrigo Oréfice, pela ajuda, discussão e ensinamentos.

Aos amigos da equipe da Luciana, em especial à Millene, Flávia, Josiane, Fábio, Helô e Raquel, por me acolherem tão bem no laboratório, pelas conversas, carinho, e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Mariem e a toda a sua equipe, especialmente a Lili e a Luciana que não só abriram as portas do laboratório, como também me ajudaram com os experimentos e me acolheram imensamente bem.

À Elionai e a doutora Maria Irene Yoshida pela colaboração.

À Professora Dra. Francine Behar-Cohen por me receber tão bem em seu laboratório no INSERM, acreditar e valorizar o meu trabalho.

Aos meus colegas do INSERM pela ajuda e companheirismo, em especial à Marilyn que foi um verdadeiro anjo na minha vida, Brigitte Goldenberg que me acolheu imensamente bem e a Charlotte Soler pela confiança no meu trabalho.

Às minhas amigas brasileiras de Paris Juliana e Lorena, pelo constante apoio, amizade, ideias, discussões, colaborações, carinho e positivismo.

À Lethícia e Michelle pela imensa ajuda sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho, e pela grande amizade que levarei comigo para sempre.

Aos meus amigos da Funed, pelos momentos de descontração, carinho e apoio nos momentos difíceis e complicados que eu passei nesse longo caminho.

Aos amigos da Farmacotécnica que me apoiaram e me ajudaram.

À equipe do controle biológico pela viabilização do experimento em coelhos, em especial ao Dário pela dedicação e ao cuidado com os animais e o carinho comigo.

À equipe do controle de qualidade físico-químico, em especial a Carol, a Júlia e ao Léo por estarem sempre dispostos a ajudar e a disponibilizar o que fosse necessário para o bom andamento do projeto.

Ao Gustavo que me ajudou com os experimentos em coelhos, sempre com muita disposição.

À Sandra e Rebeca que me ajudaram muito com as liofilizações.

Ao professor Renes por disponibilizar o seu laboratório

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

RESUMO

A neovascularização ocular é a formação de novos vasos sanguíneos nos tecidos do olho e está envolvida em quase todas as principais doenças oculares. A neovascularização da córnea é uma complicação que pode levar à perda da visão e se desenvolve em resposta às inflamações, infecções, lesões, cirurgias, uso de lentes de contato, entre outras. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos fatores mais importantes envolvidos na neovascularização da córnea, por isso inibidores do VEGF estão sendo cada vez mais utilizados. Entre eles o bevacizumabe, um anticorpo monoclonal anti-VEGF, que se liga a todas as isoformas de VEGF-A, tem demonstrado grande eficácia no tratamento da neovascularização, incluindo da córnea. A aplicação tópica de medicamentos é a forma de tratamento desejada para doenças no segmento anterior do olho, porém são necessárias repetidas administrações e elevadas concentrações do fármaco. Como alternativa a esses inconvenientes, sistemas de liberação prolongada estão sendo estudados. Assim, nesse trabalho foi desenvolvido, caracterizado e avaliado um sistema de liberação biodegradável, constituído por poliuretano derivado de poli (ϵ -caprolactona) contendo bevacizumabe, para uso tópico. Para isso foi produzida uma dispersão aquosa de poliuretano contendo bevacizumabe que foi submetida a um processo de liofilização e prensagem. O sistema foi caracterizado e avaliado por microscopia eletrônica de varredura, análise térmica e infravermelho com transformada de Fourier. Adicionalmente, foram realizados estudos de liberação, degradação e toxicidade *in vitro* e avaliação da atividade antiangiogênica utilizando membrana corioalantóica de embrião de galinha e na córnea de coelhos. Nos modelos avaliados os grupos tratados com o bevacizumabe (Avastin[®]) e com o sistema de poliuretano contendo bevacizumabe apresentaram resultados semelhantes em relação à inibição da neovascularização. No modelo da membrana corioalantóica de embrião de galinha, o grupo tratado com o sistema de poliuretano contendo bevacizumabe reduziu a angiogênese em 50,27%, em comparação com o grupo controle negativo. No modelo de neovascularização da córnea de coelhos, a densidade média do número de vasos/campo foi reduzida em 46,87%, considerando a análise imuno-histoquímica do Factor VIII no grupo tratado com o sistema de poliuretano contendo bevacizumabe, em comparação com o controle negativo. Em

ambos os modelos, não houve diferença significativa entre o sistema de poliuretano contendo bevacizumabe e o grupo controle positivo, conduzindo a resultados semelhantes em relação à inibição da neovascularização.

Os resultados obtidos mostram que foi possível obter um sistema de liberação contendo bevacizumabe por meio de métodos reprodutíveis que disponibilizam o fármaco na sua forma biologicamente ativa. Embora o sistema ainda precise de ajustes, tais como o aumento do tempo de liberação, ele pode ser considerado promissor para a incorporação de fármacos que precisam de cuidados especiais no preparo de sistemas, como baixas temperaturas, agitação leve e ausência de solventes orgânicos.

Palavras-chave: Bevacizumabe, neovascularização da córnea, poliuretano, sistemas biodegradáveis.

ABSTRACT

Ocular neovascularization is the formation of new blood vessels in the tissues of the eye and is involved in nearly all major eye diseases. Corneal neovascularization is a complication that can lead to vision loss and develops in response to inflammation, infections, injuries, surgeries, use of contact lenses, among others. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important factors involved in corneal neovascularization. For this reason, the use of VEGF's inhibitors is on the rise. Among these, bevacizumab, an anti-VEGF monoclonal antibody that binds all isoforms of VEGF-A, has shown great efficacy in the treatment of neovascularization, including that of the cornea. The topical application of medicines is the desired treatment for diseases in the anterior segment of the eye; however, repeated administrations and high concentrations of the drug are necessary. As an alternative to these difficulties, extended-release systems are being studied. Therefore, in this work a biodegradable release system was developed, characterized, and evaluated consisting of polyurethane derived from poly (ϵ -caprolactone) containing bevacizumab for topical use. An aqueous polyurethane dispersion containing bevacizumab was produced, submitted to a lyophilization process, and compressed. The system was characterized and evaluated by scanning electron microscopy, thermal analysis, and Fourier transform infrared spectroscopy. Moreover, release studies, *in vitro* degradation and toxicity, and the evaluation of antiangiogenic activity using chick embryo chorioallantoic membrane and rabbit cornea were performed. In the evaluated models, the use of bevacizumab (Avastin[®]) and the bevacizumab-loaded polyurethane device led to similar results regarding neovascularization inhibition. In the chorioallantoic membrane model, the bevacizumab-loaded polyurethane device reduced angiogenesis by 50.27% when compared to the negative control group. In the rabbit model of corneal neovascularization, the mean density of vessels/field was reduced by 46.87% considering Factor VIII immunohistochemistry picture analysis in the bevacizumab-loaded polyurethane device group as compared to the negative control sections. In both models, no significant difference could be identified between the bevacizumab-loaded polyurethane device and the positive control group, leading to similar results regarding neovascularization inhibition. The results show that it was possible to obtain a release system containing bevacizumab through reproducible methods that

provide the drug in its biologically active form. Although the system still needs adjustments, such as increasing the release time, it can be considered promising for the incorporation of drugs that need special care in the preparation of systems, such as low temperatures, mild shaking, and the absence of organic solvents.

Keywords: Bevacizumab, corneal neovascularization, polyurethane, biodegradable systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema demonstrando a anatomia do olho.....	24
Figura 2 - Camadas da córnea	25
Figura 3 - Estrutura geral de um anticorpo monoclonal e seus fragmentos	34
Figura 4 - Arranjo estrutural de uma molécula de anticorpo IgG. Á esquerda está representado o esquema de um anticorpo completo e à direita as folhas-β que compõem cada domínio.	34
Figura 5 - Esquema das estruturas de domínios nos poliuretanos	40
Figura 6 – Etapas da síntese da dispersão aquosa de poliuretano.....	49
Figura 7 - Aplicação de termografia para confirmar a indução da angiogênese. Visualização da indução da angiogênese no olho do coelho (A), termograma do olho do coelho (B), representação gráfica das temperaturas (C) e mapa de superfície 3D de temperaturas (D).	63
Figura 8 - Fotografia da pastilha formada após a etapa de prensagem (A) e no formato do sistema (B).....	68
Figura 9 - Micrografia de amostras da superfície do sistema em aumento de 200 vezes.	69
Figura 10 - Micrografias de amostras da superfície dos sistemas contendo bevacizumabe antes (A) e após 2 dias (B) de incubação em tampão PBS em aumento de 200 vezes.....	69
Figura 11 - Curvas TG (em preto) e DTG (em laranja) da PUD-LP	70
Figura 12 - Curvas TG do sistema contendo o sistema (preto) e a Bevacizumabe-SCL (azul).....	71
Figura 13 - Curva de DSC da Bevacizumabe-SCL	72
Figura 14 - Curvas de DSC referente a amostra da Bevacizumabe-SCL (azul escuro) e ao segundo aquecimento das amostras da PUD-LP (preto), do sistema (vermelho) e do sistema branco (azul claro) todos liofilizados e prensados.	73
Figura 15 - Espectro de FTIR PUD-LP.....	75
Figura 16 - Espectro de FTIR da Bevacizumabe-SCL (azul), do sistema (vermelho) e da PUD-LP (preto)	76
Figura 17 - Espectro de FTIR da PUD-LP (preto), sistema antes do estudo de liberação (vermelho), Bevacizumabe-SCL (azul escuro), sistema branco (azul claro) e sistema após o estudo de liberação (verde).....	77
Figura 18 - Curva de deconvolução da banda da amida I de uma Bevacizumabe-SCL.....	80
Figura 19 - Curvas de deconvolução da banda da amida I de amostras sistema antes do estudo de liberação (A) e após o estudo de liberação(B).....	81
Figura 20 - Espectro de varredura do bevacizumabe pelo detector DAD do cromatógrafo, onde pode ser observado o λ máximo de absorção próximo a 205 nm.....	82

Figura 21 - Sobreposição dos picos da Bevacizumabe-SCL e da solução comercial de bevacizumabe.....	86
Figura 22 - Sobreposição em escala normal (A) e ampliada (B) dos cromatogramas do bevacizumabe e do sistema, indicando a formação de moléculas de baixo massa molecular. .	87
Figura 23 - Perda de peso relacionada à degradação <i>in vitro</i> dos sistemas contendo bevacizumabe.....	89
Figura 24 - Viabilidade das células Mio-M1 incubadas no meio de cultura contendo produtos de degradação do sistema com menor concentração (Sistema 1), sistema com maior concentração (Sistema 2), PUD-LP com menor concentração (PUD 1), com maior concentração (PUD 2), solução comercial de bevacizumabe com menor concentração (Bevacizumabe 1), solução comercial de bevacizumabe com maior concentração (Bevacizumabe 2), PUD + hidrazina com menor concentração (PUD + hidra 1), PUD + hidrazina com maior concentração (PUD + hidra 2) e sistema branco equivalente a maior concentração do sistema (Sistema branco 2). (**p < 0,01 – ANOVA e Bonferroni).....	90
Figura 25 - SDS-PAGE 7,5% (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) corado com nitrato de prata. Padrão de massa molecular Sigma (número do catálogo SDS6H2) (P), amostras do sistema (1), da solução comercial de bevacizumabe (2), do controle positivo (solução comercial de bevacizumabe submetida à mesma condição do sistema) (3) e do sistema branco (4). O sistema, o controle positivo e o sistema branco foram incubadas em PBS pH 7,4 a 37°C e 30 RPM por 24 horas.	92
Figura 26 - Efeito do sistema na inibição da angiogênese no ensaio da CAM. Controle negativo - CAM (CN) (A), sistema – CAM (B), solução comercial de bevacizumabe - CAM (C) e porcentagem de vasos sanguíneos na CAM após os tratamentos (D). Os valores são expressos de acordo com o grupo CN, o qual foi fixado em 100%. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão relativo (n = 14). Os valores são significativamente diferentes do grupo CN para sistema PUD bevacizumabe carregado e solução comercial de bevacizumabe (teste de comparação múltipla de *** p <0,001, ANOVA-Bonferroni).....	94
Figura 27 - Fotografias dos olhos dos coelhos demonstrando o local onde ocorreu a lesão alcalina no dia da indução da neovascularização, corado em amarelo, utilizando colírio específico para diagnosticar úlceras na córnea (A) e 24 horas após a indução da neovascularização (B).....	97
Figura 28 - Média dos escores dos sinais clínicos após o tratamento da neovascularização corneal induzida. Escores: 0 não apresenta problema, 1 discreto, 2 moderado e 3 intenso.	98
Figura 29 - Fotomicrografia da córnea de coelho com imunomarcção para Fator VIII mostrando pequenos vasos (setas). Sistema polimérico Advance HRP (DAKO) contracorado com Hematoxilina. Grupo controle negativo (PBS) (A) e tratado com o sistema (B).....	101
Figura 30 - Número de vasos em seções do tecido da córnea de coelhos, corados com HE (A) e Fator VIII (B) nos grupos: controle negativo (CN), sistema e solução comercial de	

bevacizumabe. O número total de vasos/campo (densidade microvascular) foi calculado. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=8). Os valores são significativamente diferentes do grupo NC para sistemas de PUD contendo bevacizumabe e solução comercial de bevacizumabe (** p <0,01 e *** p <0,001 - Bonferroni).101

Figura 31 - Fotomicrografia da córnea de coelho com imunomarcção para VEGF mostrando pequenos vasos (setas). Sistema polimérico Advance HRP (DAKO) contracorado com Hematoxilina, após tratamento com a solução comercial de bevacizumabe (A) e o sistema (B).102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulação (% em massa) das dispersões aquosas de poliuretano.....	48
Tabela 2 - Composição da fase móvel	53
Tabela 3 - Composição dos géis de concentração e separação	59
Tabela 4 - Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para amostra de PUD.....	74
Tabela 5 - Porcentagem de monômeros e agregados em diferentes temperaturas de armazenamento	85
Tabela 6 - Porcentagem de monômeros e agregados da Bevacizumabe-SCL em PBS pH 7,4 submetidos diferentes condições de estresse.....	85
Tabela 7 - Resultado para a expressão de VEGF em córneas de coelhos avaliadas (n = 8) ..	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ANOVA	Análise de variância
Anti-VEGF	Anti-fator de crescimento endotelial vascular
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
Bevacizumabe-SCL	Bevacizumabe solução comercial liofilizada
CAM	Membrana corioalantóica de embrião de galinha
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CN	Controle negativo
DAD	Do inglês - Diode array detector
DMPA	Ácido 2,2 –Bis (hidroximetil) propiônico
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DMV	Densidade microvascular
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
EMA	Do inglês - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
FDA	Do inglês - Food and Drug Administration
FGF	Fatores de crescimento do fibroblasto
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
HE	Hematoxilina-eosina
Ig	Imunoglobulina
IPDI	Isoforona diisocianato
KDa	Kilodaltons
mAb	Anticorpo monoclonal
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMPs	Metaloproteinases
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)

PEDF	Fator derivado do epitélio pigmentado
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
PLGF	Fator de crescimento placentário
PUD	Dispersão aquosa de poliuretano
PUD-LP	Dispersão aquosa de poliuretano liofilizada e prensada
RNAi	Do inglês - RNA interference
RNAm	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEC	Coluna cromatográfica de exclusão por tamanho
SLF	Sistemas de liberação de fármaco
siRNA	Do inglês - <i>small-interfering</i> RNA
TEA	Trietilamina
TG	Termogravimetria
T _g	Transição vítrea
T _{onset}	Temperatura <i>on-set</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	223
2.1 Anatomia e fisiologia do olho	23
<u>2.1.1 O bulbo ocular</u>	23
<u>2.1.2 O Segmento anterior</u>	24
2.2 Neovascularização	27
<u>2.2.1 Etiologia e epidemiologia da neovascularização ocular</u>	28
<u>2.2.2 Promotores da neovascularização ocular</u>	28
<u>2.2.3 O VEGF</u>	29
<u>2.2.4 Tratamentos para a neovascularização da córnea</u>	29
2.3 Bevacizumabe	33
<u>2.3.1 Tratamento tópico</u>	36
<u>2.3.2 Sistemas de liberação de uso tópico</u>	37
<u>2.3.3 Sistemas de liberação contendo bevacizumabe</u>	38
2.4 Poliuretanos biodegradáveis desenvolvidos para aplicações biológicas ...	39
3 JUSTIFICATIVA	43
4 OBJETIVO	45
4.1 Objetivo Geral	45
4.2 Objetivos específicos	45
5 MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1 Desenvolvimento de sistemas biodegradáveis constituídos de poliuretanos e bevacizumabe	47
<u>5.1.1 Obtenção da dispersão aquosa de poliuretano (PUD)</u>	47
<u>5.1.2 Preparo dos sistemas de poliuretanos e bevacizumabe</u>	49

5.2 Caracterização dos sistemas desenvolvidos	50
<u>5.2.1 Análise morfológica dos sistemas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	<u>50</u>
<u>5.2.2 Análises térmicas</u>	<u>51</u>
5.3 Metodologia analítica para análise do bevacizumabe presente no sistema por meio de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).....	52
5.4 Avaliação da estabilidade do bevacizumabe por meio de CLAE	54
5.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do bevacizumabe a partir dos sistemas.....	55
5.6 Estudo de degradação <i>in vitro</i> dos sistemas	56
5.7 Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade celular pela redução do MTT.....	56
5.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)	58
5.9 Avaliação da angiogênese utilizando o modelo da membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)	59
5.10 Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do sistema em modelo animal.....	61
<u>5.10.1 Animais</u>	<u>61</u>
<u>5.10.2 A indução da neovascularização</u>	<u>61</u>
<u>5.10.3 Avaliação da indução da neovascularização</u>	<u>62</u>
<u>5.10.4 Protocolo de tratamento</u>	<u>63</u>
<u>5.10.5 Avaliação clínica</u>	<u>64</u>
<u>5.10.6 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica</u>	<u>64</u>
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.1 Desenvolvimento de sistemas biodegradáveis constituídos de poliuretanos e bevacizumabe.....	67
6.2 Caracterização dos sistemas desenvolvidos	68
<u>6.2.1 Análise morfológica dos sistemas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u>	<u>68</u>
<u>6.2.2 Termogravimetria</u>	<u>70</u>

<u>6.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</u>	71
<u>6.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier</u>	74
6.3 Metodologia analítica para análise do bevacizumabe por CLAE	82
6.4 Avaliação da estabilidade do bevacizumabe por meio de CLAE	84
6.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i> dos sistemas contendo bevacizumabe	86
6.6 Estudo de degradação <i>in vitro</i> dos sistemas	89
6.7 Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade celular pela redução do MTT	90
6.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)	91
6.9 Avaliação da angiogênese utilizando o modelo CAM	94
6.10 Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do sistema em modelo animal	96
<u>6.10.1 Avaliação clínica</u>	96
<u>6.10.2 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica</u>	100
7 CONCLUSÃO	106
8 PERSPECTIVAS	1089
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A neovascularização da córnea é uma condição grave que pode levar a uma profunda redução da visão. Ela pode ocorrer em algumas condições patológicas, como por exemplo: inflamação, infecção e doenças degenerativas ou traumáticas, resultando na produção de moléculas pró-angiogênicas. Estas doenças são muitas vezes seguidas de redução da acuidade visual e cegueira, podendo afetar milhões de pessoas em todo o mundo (BENAYOUN *et al.*, 2013).

Várias modalidades de tratamento como a administração tópica de corticosteroides, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), terapia fotodinâmica e a fotocoagulação a laser são utilizados. Porém esses tratamentos apresentam uma eficácia clínica limitada e alguns eventos adversos podem ocorrer, tais como catarata e hipertensão ocular (JIN-HONG *et al.*, 2012). O uso de fármacos anti-fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF) têm demonstrado sucesso *in vivo* e são considerados hoje em dia o tratamento de escolha.

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal (mAb) anti-VEGF humanizado que se liga a todas isoformas do fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A) (GERBER; FERRARA, 2005). Ele tem sido largamente utilizado na oftalmologia para o tratamento do edema macular, neovascularização da coróide e glaucoma neovascular (ABEDI *et al.*, 2014; JIMÉNEZ-ORTIZ *et al.*, 2012; STEFANINI; AREVALO; MAIA, 2013). Trabalhos recentes demonstraram que a aplicação tópica de bevacizumabe foi capaz de reduzir a angiogênese na córnea (CHENG *et al.*, 2012; KOENIG *et al.*, 2009).

A administração ocular tópica de fármacos na forma de colírio, normalmente, apresenta um tempo de contato mínimo com a superfície do olho, o que leva a uma pequena biodisponibilidade de cerca de 5% do fármaco. Assim, instilações repetidas diariamente são necessárias, o que pode causar efeitos adversos sistêmicos e oculares, levando a uma redução da adesão dos pacientes ao tratamento (SILVA-CUNHA *et al.*, 2003; URTTI, 2006). Esse cenário estimula o desenvolvimento de novas formas de tratamento, sendo os sistemas de liberação de fármaco (SLF) uma

INTRODUÇÃO

alternativa eficaz, uma vez que eles são capazes de aumentar o tempo de contato do medicamento no local, aumentando a sua biodisponibilidade (SAETTONE; SALMINENB, 1995).

No entanto, os tipos de polímeros utilizados em SLF contendo produtos biológicos, como os mAbs é limitado, pois grande parte dos polímeros precisam de etapas no processo de preparo dos sistemas que requerem altas temperaturas e solventes orgânicos (PACE *et al.*, 2004; WANG, 2005). Esses processos podem causar desnaturação, agregação ou adsorção do anticorpo (MAHLER *et al.*, 2009; VERMEER; NORDE, 2000), resultando em mudanças de conformação e perda de atividade.

Os poliuretanos são polímeros sintéticos, com propriedades físicas satisfatórias, que apresentam boa biocompatibilidade e que têm aumentado a sua importância nos últimos anos. Eles podem ser empregados em diversas áreas, incluindo farmácia e medicina, onde são frequentemente utilizados em engenharia de tecidos e no preparo de SLF (CHERNG *et al.*, 2013).

Para eliminar a necessidade de utilização de solventes orgânicos para o preparo de SLF, foram desenvolvidas dispersões de poliuretanos que apresentam a água como principal componente, sendo por isso conhecida como dispersão aquosa de poliuretano (PUD) (AYRES; ORÉFICE; YOSHIDA, 2007).

Neste trabalho, um novo sistema de liberação contendo bevacizumabe, preparado a partir de PUD, foi desenvolvido e avaliado para ser utilizado no tratamento da neovascularização da córnea.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia e fisiologia do olho

2.1.1 O bulbo ocular

O bulbo ocular é uma estrutura que ocupa um terço da órbita óssea. Ele é composto por três camadas (ou túnicas) concêntricas principais:

- uma camada exterior protetora fibrosa, que compreende a esclera e a córnea;
- uma camada média que é ricamente vascular, responsável pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes para a camada exterior da retina e para as estruturas da câmara anterior, que é formada pela coróide, corpo ciliar e íris;
- finalmente pela camada mais interna composta pela retina, que é a neural. A retina tem várias camadas de células e contém fotorreceptores sensíveis à luz, os cones e bastonetes. Estas células transformam a energia luminosa em sinais nervosos, os quais são transmitidos para o cérebro pelo nervo óptico (MALHOTRA *et al.*, 2011).

Uma maneira usual de dividir o olho para facilitar didaticamente seu estudo é em segmentos anterior e posterior (**Figura 1**). O segmento anterior compreende a córnea, o limbo, as câmaras anterior e posterior, íris, cristalino e corpo ciliar. O segmento posterior compreende a esclera, a coróide, a retina, o humor vítreo e o nervo óptico (HARDMAN; LIMBIRD, 2012).

O segmento posterior do olho é de difícil acesso para tratamento, seja por via local ou sistêmica, devido às barreiras anatômicas e vasculares desse órgão (HARDMAN; LIMBIRD, 2012).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

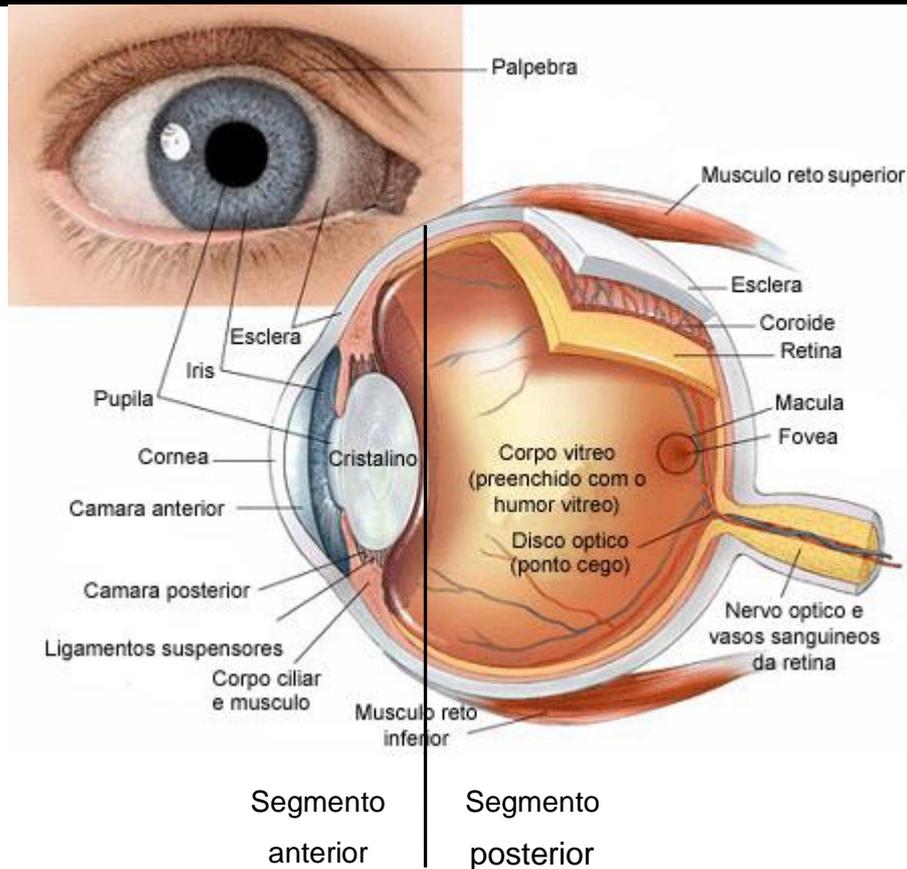


Figura 1 – Esquema demonstrando a anatomia do olho

Fonte: Adaptado de <http://www.vision-and-eye-health.com/eye-anatomy.html>

2.1.2 O Segmento anterior

2.1.2.1 Córnea

A córnea é um tecido avascular transparente, que atua como a primeira e principal barreira contra infecções do olho. Juntamente com o filme da lágrima eles proporcionam 2/3 do poder de refração total do olho, que visa formar uma imagem nítida na retina. A sua clareza é o resultado de muitos fatores incluindo sua anatomia e a fisiologia estrutural dos componentes celulares (DELMONTE; KIM, 2011).

Em média, a córnea de um adulto apresenta um eixo horizontal de $11,71 \pm 0,42$ mm (RUFER; SCHRÖDER; ERB, 2005). A córnea humana é uma camada escamosa estratificada, não queratinizada, caracterizada pela extrema uniformidade de limbo a

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

limbo e composta por 5 camadas (**Figura 2**), sendo 3 camadas celulares (epitélio, estroma e endotélio) e 2 camadas de interface (Membrana de Bowman e membrana de Descemet) (DELMONTE; KIM, 2011).

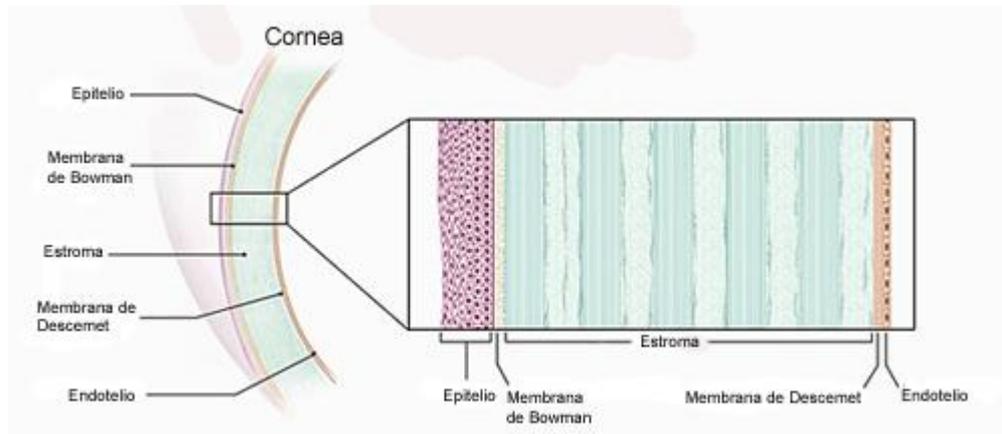


Figura 2 - Camadas da córnea

Fonte: Adaptado de <http://www.nei.nih.gov/health/cornealdisease/>

A maioria dos nutrientes que a córnea necessita é obtida por difusão a partir de fluidos circundantes como o humor aquoso, o filme lacrimal e pelo fluido intersticial fornecido pela vasculatura pericorneana (BEEBE, 2008).

O oxigênio apresenta um problema especial, devido à sua baixa solubilidade em meios aquosos. Assim, a maior parte do oxigênio que atinge o endotélio da córnea vem do ar e se difunde através do epitélio e do estroma (BEEBE, 2008).

A córnea apresenta a singularidade de ser essencialmente desprovida de vasos sanguíneos e linfáticos. Esta avascularidade é um processo ativo e tem sido chamado de privilégio angiogênico da córnea. A sua integridade é mantida por uma série de fatores e mecanismos celulares. Quando estes estão comprometidos, o resultado final pode ser a invasão de vasos na córnea, que é uma característica patológica denominada neovascularização da córnea (MADDULA *et al.*, 2011).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.2.2 Íris

A íris é um diafragma fino, contrátil, pigmentado que divide o segmento anterior em câmaras anterior e posterior, com uma abertura central que é a pupila (MALHOTRA *et al.*, 2011). Ela é localizada entre o cristalino e a córnea e regula a quantidade de luz que passa através deles e incide sobre a retina (DAVIS-SILBERMAN; ASHERY-PADAN, 2008)

2.1.2.3 Limbo

Entre a córnea e a esclera situa-se uma zona de transição com 1 a 2 mm de largura chamada de limbo. Os vasos sanguíneos do limbo, bem como as lágrimas fornecem nutrientes importantes e mecanismos de defesa imunológica para a córnea (HARDMAN; LIMBIRD, 2012). Supostamente ele apresenta múltiplas funções como nutrição, vigilância imunológica e controle da pressão intraocular (ROY; DAVAGNANAM; EVANSON, 2012)

2.1.2.4 Corpo ciliar

O corpo ciliar secreta o humor aquoso pelo epitélio do corpo ciliar e promove um processo conhecido como acomodação, que é uma contração do músculo ciliar capaz de suspender o cristalino e permitir focalizar objetos próximos (HARDMAN; LIMBIRD, 2012).

2.1.2.5 Cristalino

O cristalino apresenta uma estrutura transparente e biconvexa com aproximadamente 10 mm de diâmetro e é responsável por refratar e focar a luz na retina. Ele é avascular e está envolvido por uma cápsula. Nutrientes, oxigênio e resíduos são trocados entre a sua cápsula e o seu epitélio (WHITELEY; PEIFFER, 2002).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 Neovascularização

A neovascularização é a formação de novos vasos sanguíneos, podendo ocorrer por dois mecanismos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células precursoras como os angioblastos e ocorre principalmente durante a embriogênese. A angiogênese é a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes e está associada a vários processos diferentes, tanto fisiológicos quanto patológicos (AUERBACH; AUERBACH, 1994).

Judah Folkman foi o pioneiro na área da angiogênese e a estudou em tumores no início de 1970. Ele observou que os tumores permanecem em um estado de dormência até estabelecer um suprimento de sangue, mas uma vez que esses vasos tenham se formado para fornecer nutrientes e outros fatores induzidos, eles crescem com muita rapidez (AUERBACH; AUERBACH, 1994).

A neovascularização ocular é um processo destrutivo generalizado. Ela ocorre em todo o mundo e está envolvida em quase todas as principais doenças oculares e causas de cegueira, como a oclusão da veia central da retina, a retinopatia diabética, a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e a retinopatia da prematuridade, entre outras. A neovascularização ocular abrange um vasto espectro geográfico, sendo prevalente em todo o mundo, afetando os dois sexos e atingindo de recém-nascidos a idosos (LEE; WANG; ADAMIS, 1998).

A neovascularização da córnea é uma complicação ameaçadora da visão que pode se desenvolver em resposta a inúmeras causas como inflamações, infecções bacterianas, virais, parasitárias, injúrias, cirurgias, doenças autoimunes, uso de lentes de contato, distrofias, transplante de células tronco do limbo e neoplasias. O tracoma é a principal causa infecciosa de cegueira do mundo e o vírus *Herpes simplex* é a principal causa de cegueira nos países desenvolvidos. A neovascularização altera a acuidade visual, pois induz o edema do estroma, a infiltração celular, a deposição de lipídeos, a hemorragia e a cicatrização (STEVENSON *et al.*, 2012).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 Etiologia e epidemiologia da neovascularização ocular

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o número estimado de pessoas com deficiência visual no mundo é de 285 milhões, destes, 39 milhões são cegos e 246 milhões sendo classificados como de baixa visão. 65% das pessoas com deficiência visual e 82% de todos os cegos têm 50 anos ou mais (WHO, 2012). Esse número é tão preocupante que em maio de 2013 a 66^a Assembleia Mundial da Saúde aprovou a resolução WHA66.4 (WHA, 2013), cujo objetivo é promover um plano de ação global de 2014 a 2019, tendo como meta a redução da prevalência de deficiência visual evitável em 25% até 2019, considerando os dados de 2010 como base. Doenças do segmento anterior são a principal causa de cegueira do mundo, estando as doenças que afetam a córnea como a terceira causa de cegueira, atrás apenas da catarata e do glaucoma (WHO, 2012).

2.2.2 Promotores da neovascularização ocular

Existem vários fatores envolvidos na neovascularização da córnea, entre eles os fatores de crescimento do fibroblasto (FGF) 1 e 2 foram amplamente estudados, o FGF-1 é expresso no epitélio da córnea normal, enquanto que o FGF-2 apresenta grande expressão após lesões na córnea. A córnea é um centro de produção de angiostatina, que é um fator antiangiogênico. A endostatina que também apresenta atividade antiangiogênica, pode ser encontrada na córnea e inibe a neovascularização induzida pelo FGF e pelo VEGF. O fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) é encontrado com abundância na córnea e também foi encontrado no fluido lacrimal de indivíduos saudáveis, também é antiangiogênico e inibe a neovascularização induzida pelo FGF. As metaloproteinases (MMPs) são um grupo de enzimas proteolíticas e a córnea expressa 08 das 24 MMPs identificadas e o seu papel na neovascularização é ambíguo, pois essas moléculas possuem a capacidade de ser tanto próangiogênica quanto antiangiogênicas, dependendo da condição. O VEGF é encontrado extensivamente no epitélio da córnea vascularizada e muita atenção tem sido dada a ele desde que foi demonstrado que sua expressão aumenta no tecido isquêmico, se tornando um dos principais fatores promotores da angiogênese (QAZI; MADDULA; AMBATI, 2009).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.3 O VEGF

O VEGF é um dos fatores mais importantes envolvidos na neovascularização da córnea. Ele é considerado o principal mediador da angiogênese, sendo de grande importância para o desenvolvimento da angiogênese fisiológica e patológica. É uma glicoproteína de 46 Kilodaltons (kDa) com atividade angiogênica e de permeabilidade vascular. Ele é expresso por células oculares de tipos diferentes como as células epiteliais pigmentares, pericitos, células vasculares endoteliais, células ganglionares e da neuróglia e se liga com alta afinidade aos receptores de membrana com atividade tirosina quinase VEGFR-1 e VEGFR-2. A sua expressão é induzida principalmente em condições de hipóxia (BAINBRIDGE *et al.*, 2002; DAS; MCGUIRE, 2003).

Atualmente, a família do VEGF inclui o VEGF-A, -B, -C, -D, -E e também o PLGF. No entanto, em doenças humanas o VEGF-A é considerado mais importante, pois parece ser a forma mais prontamente induzida durante os episódios de hipóxia (EUBANK *et al.*, 2003). O VEGF-A existe em diferentes isoformas com 121, 145, 162, 165, 183, 189 e 206 resíduos de aminoácidos, que são geradas por “*splicing*” alternativo. As isoformas diferem na sua capacidade de se ligar ao heparan sulfato e à matriz extracelular (VEMPATI; POPEL; MAC GABHANN, 2014).

Agentes neutralizadores do VEGF têm demonstrado grande vantagem no tratamento de condições oculares patológicas causadas por neovascularização como a DMRI, retinopatia diabética proliferativa, edema macular, entre outras doenças. Descobertas recentes sugerem que a inibição do VEGF pode ser uma modalidade terapêutica eficaz para a neovascularização da córnea (JIN-HONG *et al.*, 2012).

2.2.4 Tratamentos para a neovascularização da córnea

Uma variedade de novas estratégias tem sido desenvolvida para controlar processos de neovascularização. Os corticosteróides inibem a angiogênese por suprimir o recrutamento de células inflamatórias, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a liberação de ácido araquidônico (CURSIEFEN *et al.*, 2001), mas são geralmente

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ineficazes no tratamento da neovascularização estável. O uso a longo prazo pode resultar em efeitos adversos como catarata, hipertensão ocular, afinamento corneano e o surgimento de infecções oportunistas, tornando essa opção uma escolha insustentável (STEVENSON *et al.*, 2012).

Os AINEs são outra classe de agentes anti-inflamatórios que têm sido utilizados no tratamento da neovascularização da córnea. AINEs inibem a produção de prostaglandinas que estimulam angiogênese, mas infelizmente, a eficácia é variável e, por vezes, acompanhada de efeitos secundários graves, como por exemplo, ulceração da córnea e até perfuração, limitando a sua utilidade clínica, particularmente no contexto de pacientes com doença da superfície ocular concomitante (STEVENSON *et al.*, 2012).

A fotocoagulação a laser consiste em um feixe de luz que é focado seletivamente no vaso de interesse, resultando na coagulação induzida pelo calor e na oclusão do vaso. Infelizmente, o dano tecidual induzido pelo laser pode estimular a liberação de fatores pró-angiogênicos que promovem o desenvolvimento de uma circulação colateral e podem ainda causar lesão e destruição de células endoteliais e alterações na membrana de Descemet (BARKANA; BELKIN, 2000; KRAUSS; PULIAFITO; STEINERT, 1986; VAIKOUSSIS; BISOGIANNIS; MARGARITIS, 1993; STEVENSON *et al.*, 2012).

A terapia fotodinâmica é outro procedimento utilizado. Nesse método, um agente de fotossensibilização, como a verteporfina, é administrado por via intravenosa e ativado localmente por um laser de comprimento de onda específico, resultando na liberação de espécies reativas de oxigênio que danificam localmente as células endoteliais promovendo trombose vascular. Quando usado com um agente de fotossensibilização adequado parece ser um tratamento seguro e eficaz, mas os custos elevados têm limitado a sua utilização (BRATS, 2008; WILSON, 2002).

Outra opção é a diatermia com agulha fina que é um promissor procedimento cirúrgico. Nesse procedimento, uma agulha é inserida no limbo, paralelamente e na mesma profundidade do vaso de interesse, podendo ainda ser inserida dentro do

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

mesmo para o caso de vasos maiores. Uma sonda de diatermia é colocada no modo de coagulação em contato com a agulha, resultando na cauterização do vaso. Cada vaso é tratado individualmente. Esse é um procedimento seguro e eficaz, mas um dos possíveis efeitos adversos é o esbranquiçamento transitório da córnea e hemorragia intraestromal, além da possível necessidade de repetir o processo devido à formação de novos vasos colaterais (PILLAI; DUA; HOSSAIN, 2000).

O último recurso para pacientes com neovascularização da córnea que não respondem a outras formas de tratamento seria a restauração da superfície ocular por meio de transplante (HUI-KANG *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2005).

Devido ao fato do VEGF ser um dos fatores mais importantes envolvidos na neovascularização da córnea, os inibidores dessa molécula estão sendo cada vez mais utilizados. Eles têm demonstrado sucesso *in vivo* e estão se tornando hoje em dia o tratamento de escolha.

2.2.4.1 Tratamentos com anti-VEGF para processos de neovascularização ocular

Em dezembro de 2004 o órgão FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) aprovou o pegaptanibe (Macugen[®], Pfizer). Esse foi o primeiro agente anti-VEGF aprovado para uso intraocular nos Estados Unidos. Ele é um aptâmero anti-VEGF de RNA que se liga especificamente ao VEGF₁₆₅ e foi aprovado para o tratamento da DMRI neovascular (NG *et al.*, 2006).

Existe um grande potencial de aplicação tópica para o pegaptanibe (HOSSEINI; NEJABAT, 2007), contudo, não existem estudos demonstrando a ação desse medicamento administrado topicamente. Akar *et al.* (2013) realizaram um estudo comparativo com o pegaptanibe sódico, o bevacizumabe e o ranibizumabe para a neovascularização da córnea, mas os medicamentos foram aplicados por meio de uma injeção subconjuntival. Nesse estudo a neovascularização da córnea foi induzida em olhos de ratos e embora todos tenham apresentado inibição da neovascularização, o bevacizumabe foi mais efetivo que os outros dois

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

medicamentos. Mesmo no tratamento da DMRI neovascular estudos demonstraram que pegaptanibe é menos eficaz do que outros medicamentos anti-VEGF e por isso esse medicamento não é mais amplamente utilizado na maioria dos países (SEMERARO *et al.*, 2013).

O ranibizumabe (Lucentis ®; Genentech) é um anticorpo humanizado do tipo anti-VEGF-A. Ele é um fragmento de anticorpo com uma massa molecular de 48 kD, especificamente desenvolvido para o uso intraocular. Esse medicamento foi aprovado pelo FDA em junho de 2006 para o tratamento DMRI (LOWE *et al.*, 2007).

Existem alguns estudos envolvendo aplicações tópicas de ranibizumabe com resultados que apresentam eficácia e segurança na inibição da neovascularização utilizando a mesma posologia do bevacizumabe (FERRARI *et al.*, 2013; STEVENSON *et al.*, 2012). Por outro lado, existem também relatos da baixa eficácia quando comparado ao bevacizumabe (KIM J.-H. *et al.*, 2013). Mesmo sabendo que o bevacizumabe ainda não foi aprovado para tratamento da neovascularização ocular, sendo assim utilizado de maneira “*off-label*”, em relação ao ranibizumabe ele é preferido pelos médicos, devido ao seu custo significativamente mais baixo, em média 39 vezes menor (SEMERARO *et al.*, 2013).

Aflibercept (EYLEA®, Bayer), também chamado de VEGF Trap, foi o mais recente membro anti-VEGF aprovado para uso intraocular pelo FDA em novembro de 2011 e pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) para tratamento da DMRI do tipo neovascular em 2012. Trata-se de uma proteína de fusão que se liga a todas as isoformas de VEGF-A e VEGF-B, bem como ao PLGF (SEMERARO *et al.*, 2013).

Existem evidências preliminares da eficácia demonstrada de VEGF Trap na prevenção da neovascularização da córnea em modelos animais, contudo, a aplicação tópica não foi testada e o tratamento tem sido realizado sempre por injeções (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Atualmente, a maioria das pesquisas sobre o uso do RNAi (do inglês, RNA interference) como modalidade terapêutica tem se concentrado no siRNA (do inglês,

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

small-interfering RNA), pois esse apresenta uma sequência específica que é capaz de reconhecer e clivar o RNA mensageiro (RNAm) complementar, apresentando potencial para ser uma ferramenta poderosa contra a neovascularização da córnea, porque, ao contrário de outros métodos extracelulares, bloqueia os efeitos intracelulares do gene VEGF. No entanto, a implementação de tratamentos oculares baseados em siRNA ainda estão em fase inicial, devido aos grandes desafios relacionados à segurança e à especificidade dos siRNAs (GUZMAN-ARANGUEZ; LOMA; PINTOR, 2013).

2.3 Bevacizumabe

Os mAb são glicoproteínas que pertencem à superfamília da imunoglobulina (Ig). Esta pode ser dividida em cinco isotipos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, mas somente as IgG são produzidos para fins terapêuticos por meio de engenharia genética (FEKETE *et al.*, 2013).

O bevacizumabe é um mAB humanizado recombinante do tipo IgG1 que liga e inibe a atividade biológica do VEGF humano, tanto *in vitro* como *in vivo*, prevenindo a ligação do VEGF aos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2. Ele contém regiões estruturais humanas, com regiões ligantes de antígenos de um anticorpo murino humanizado, que se liga ao VEGF solúvel (MOULD; SWEENEY, 2007).

IgGs são grandes glicoproteínas tetraméricas medindo aproximadamente 150 kDa, estruturalmente compostas por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas idênticas (~ 50 kDa) e duas cadeias leves idênticas (~ 25 kDa), compostas por segmentos repetitivos, ligados através de várias ligações dissulfeto inter/intra cadeia formando uma estrutura característica em forma de Y. Há regiões na molécula de Ig que são extremamente variáveis (regiões hipervariáveis e variáveis) e que dão a ela a característica específica contra o antígeno (**Figura 3**) (FEKETE *et al.*, 2013).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

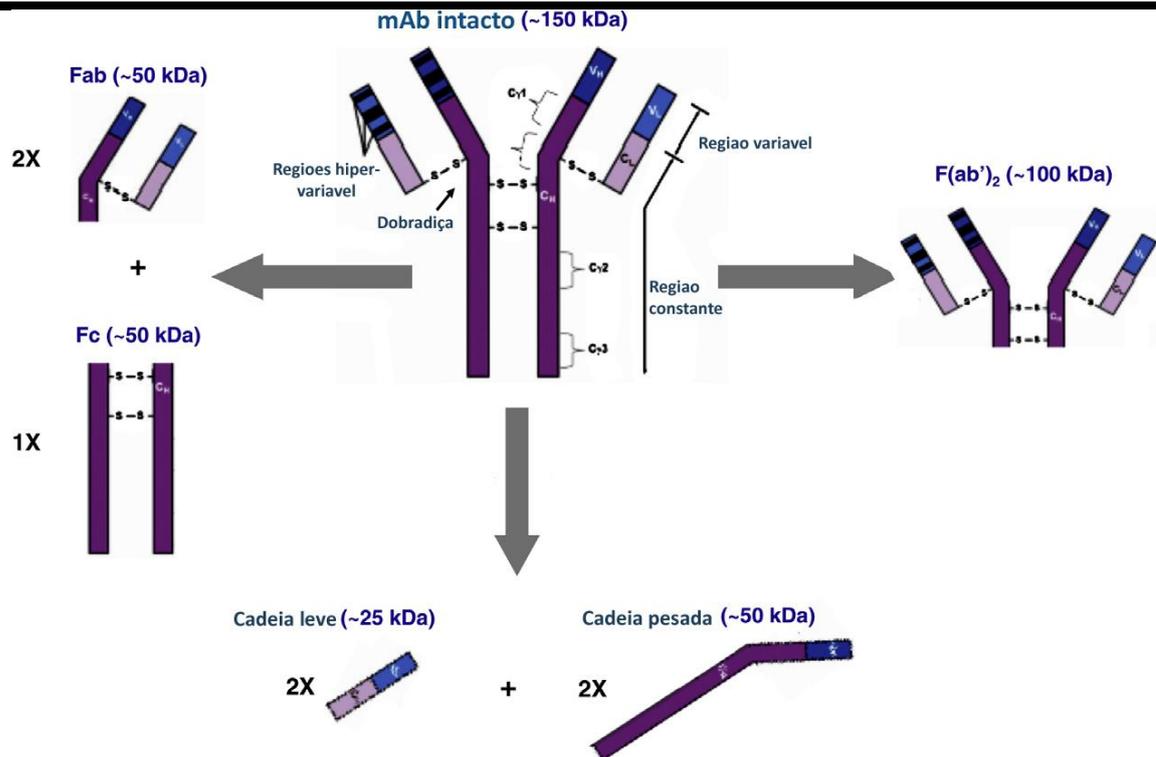


Figura 3 - Estrutura geral de um anticorpo monoclonal e seus fragmentos

Fonte: Adaptado de Fekete *et al.*, 2013

Os segmentos repetitivos dobram-se independentemente para formar unidades funcionais compactas denominadas domínios de Igs. Cada domínio do anticorpo bevacizumabe tem uma estrutura tridimensional composta por um “sanduiche” de duas cadeias de folhas- β (**Figura 4**) unidas por ligações dissulfeto (ALBERTS *et al.*, 2010).

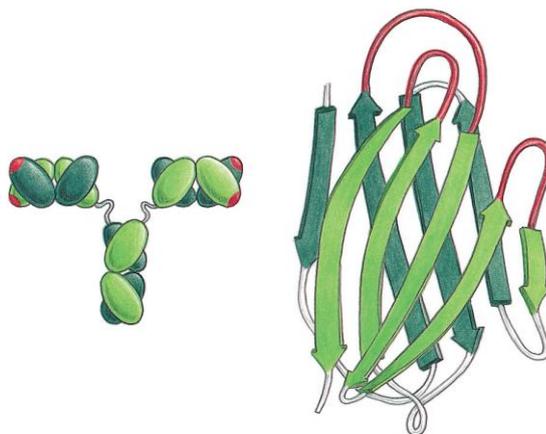


Figura 4 - Arranjo estrutural de uma molécula de anticorpo IgG. À esquerda está representado o esquema de um anticorpo completo e à direita as folhas- β que compõem cada domínio.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Comercializado com o nome de Avastin[®] (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Brasil), o bevacizumabe foi aprovado pelo FDA em fevereiro de 2004 e em janeiro de 2005 pela EMEA (do inglês, *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) e está registrado na ANVISA desde maio de 2005. Este fármaco foi aprovado pelo FDA para o tratamento de carcinoma colorretal metastático, e hoje, no Brasil ele é indicado para tratamento de alguns tipos de câncer em associação com quimioterapia ou outros tipos de medicamento.

O bevacizumabe não tem aprovação para uso oftálmico, mas ele tem sido utilizado de maneira “*off-label*” em tratamentos para a neovascularização ocular, devido à sua eficácia no tratamento da neovascularização. Existem vários estudos concluídos e em andamento demonstrando redução parcial da neovascularização da córnea por meio de aplicação tópica, subconjuntival e intraocular (JIN-HONG *et al.*, 2012).

Ahmed *et al.* (2009) induziram a neovascularização corneana em coelhos utilizando o método da queimadura da cornea com solução de hidróxido de sódio (NaOH). Nesse estudo, a administração da solução comercial de bevacizumabe foi realizada por via tópica e subconjuntival, o que permitiu a comparação de resultados entre as duas formas de administração. Os resultados relatados no artigo descrevem que ocorreu redução da neovascularização nos grupos tratados, porém sem uma completa redução do número de vasos. Além disso, a comparação entre as vias mostrou que, pela via subconjuntival, a redução da neovascularização foi melhor em relação à aplicação tópica.

Utilizando o mesmo método de queimadura química com solução de hidróxido de sódio, Mello *et al.* (2011) avaliaram o tratamento da neovascularização induzida em córneas de coelhos com a solução comercial de bevacizumabe injetada por via subconjuntival. Os resultados obtidos mostraram que ocorreu uma redução significativa do número de neovasos formados.

No trabalho de Lee *et al.* (2009) o método de queimadura química com solução de hidróxido de sódio foi utilizado para indução da neovascularização na córnea de camundongos. O efeito da injeção subconjuntival de bevacizumabe foi avaliado e

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

observou-se que a maior redução da neovascularização foi relacionada ao grupo que recebeu duas doses do tratamento quando comparado ao que recebeu apenas uma.

Avisar, Weinberger e Kremer (2010) utilizaram um modelo de indução de neovascularização por meio de queimadura química com uma mistura de nitrato de prata e nitrato de potássio em córnea de camundongos. Após indução, uma solução comercial de bevacizumabe foi administrada pelas vias intraocular e subconjuntival. A redução da neovascularização ocorreu nas duas vias avaliadas, porém a via intraocular apresentou maior redução.

Em caso clínico reportado por Lannetti *et al.* (2013), um paciente que apresentava lesão ocular química, simbléfaro e neovascularização da córnea foi tratado com duas doses de injeção subconjuntival da solução comercial de bevacizumabe, sendo a segunda após três semanas. A córnea do paciente apresentou regressão da opacificação e da neovascularização com consequente melhora visual.

2.3.1 Tratamento tópico

A aplicação tópica de medicamentos é a forma de tratamento desejada para doenças no segmento anterior do olho como a neovascularização da córnea. Na prática clínica, o segmento anterior do olho pode ser tratado com a administração de colírios, que é a forma farmacêutica mais utilizada no tratamento de doenças da córnea. Porém, após a instilação do colírio, o fluido lacrimal inicia o processo de remoção desse produto da superfície do olho. Embora a taxa de rotatividade (do inglês, *turnover*) lacrimal seja apenas de aproximadamente 1 μ L/min, o excesso do volume instilado é rapidamente levado para o ducto lacrimal. Outra fonte de remoção do medicamento é a sua absorção sistêmica, que pode ocorrer via mucosa do saco conjuntival ou após o direcionamento do medicamento para a cavidade nasal (URTTI, 2006). O medicamento é rapidamente drenado e por isso o tempo de absorção do fármaco é de apenas alguns minutos e a biodisponibilidade é muito baixa, tipicamente inferior a 5% (URTTI, 2006).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Elevadas concentrações e/ou frequentes administrações são usadas para atingir um nível terapêutico adequado, o que pode aumentar o risco de efeitos adversos sistêmicos, as interações medicamentosas e reduzir a adesão do paciente ao tratamento (SILVA-CUNHA *et al.*, 2003)

2.3.2 Sistemas de liberação de uso tópico

Para aumentar o tempo de permanência ocular das formulações oftálmicas tópicas, buscando reduzir a taxa de drenagem e melhorar a biodisponibilidade dos fármacos, diferentes estratégias são utilizadas. Existem colírios que contêm ciclodextrinas, tais como o Voltaren[®], Indocid[®] e Clorocil[®]. Também são utilizados agentes que aumentam a viscosidade como a hipromelose, carboximetilcelulose, álcool polivinílico, ácido hialurônico e Carbomer 940. A literatura científica também relata estudos de formulações como emulsões, lipossomas e nanopartículas (PERRIE *et al.*, 2012).

Com relação à utilização de sistemas sólidos capazes de promover uma liberação controlada do fármaco e melhorar a sua biodisponibilidade, vários estudos já foram realizados e alguns produtos foram desenvolvidos. Em 1974, Alza Corporation iniciou a comercialização do primeiro sistema ocular de liberação controlada, o Ocusert[®], indicado para tratamento de glaucoma. Esse sistema é produzido com copolímero de etileno acetato de vinila e é colocado no saco conjuntival onde libera a pilocarpina a uma taxa controlada, por até sete dias. Em 1982 o sistema Lacrisert[®] iniciou a comercialização nos EUA pela Aton Pharm Inc. para o tratamento da síndrome do olho seco. Este também é um sistema para aplicação no saco conjuntival, produzido com hidroximetilcelulose, em forma de haste com aproximadamente 1,27 milímetros de diâmetro e 3,5 mm de comprimento e deve ser aplicado 1 ou 2 vezes ao dia. Já em relação a liberação de fármacos por meio de lentes de contato, embora existam muitos estudos, não existe ainda nenhum produto comercializado aprovado no mercado (PERRIE *et al.*, 2012).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.3.3 Sistemas de liberação contendo bevacizumabe

Em função dos grandes benefícios do bevacizumabe no tratamento da neovascularização ocular, alguns estudos em desenvolvimento compreendem diferentes tipos de SLF, como por exemplo, géis termossensíveis (PARK *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2012), nanopartículas encapsuladas dentro de micropartículas (YANDRAPU *et al.*, 2013), nanolipossomas (ABRISHAMI *et al.*, 2009), nanopartículas para tratamento da neovascularização de retina e da coróide (VARSHOCHIAN *et al.*, 2013) e implantes intraoculares desenvolvidos para serem inseridos durante a operação da catarata (MOLOKHIA *et al.*, 2010). Todos esses sistemas foram administrados por técnicas invasivas e em nenhum desses estudos o objetivo foi um sistema para o tratamento da neovascularização da córnea.

A administração tópica do bevacizumabe é uma modalidade de tratamento potencial para a neovascularização da córnea, sendo a sua eficácia demonstrada recentemente em vários estudos e aplicações clínicas em pacientes com neovascularização da córnea (JIN-HONG *et al.*, 2012). DeStafeno e Kim (2007) documentaram o primeiro caso de sucesso referente ao uso de bevacizumabe tópico para tratar a neovascularização da córnea em humanos. Porém, outros estudos já haviam demonstrado a eficácia do tratamento tópico do bevacizumabe em modelos de neovascularização induzida da córnea de animais como ratos (MANZANO *et al.*, 2007). Somado a isso Kim J. Y. *et al.* (2013) demonstraram que o bevacizumabe administrado topicamente apresenta uma ação antiangiogênica mais prolongada que o bevacizumabe injetado subconjuntivamente em um modelo animal de neovascularização.

Finalmente, é importante enfatizar que o preparo de formulações contendo o bevacizumabe precisa de muito cuidado, pois ele necessita estar na sua forma ativa para se ligar ao VEGF. O anticorpo pode ser facilmente degradado durante o processo de preparo, seja por meio da agitação, do pH, do solvente e/ou da temperatura (MAHLER *et al.*, 2009 ; PACE *et al.*, 2004 ; WANG, 2005).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.4 Poliuretanos biodegradáveis desenvolvidos para aplicações biológicas

Os poliuretanos apresentam propriedades versáteis e, por isso, são um dos materiais poliméricos mais importantes. Por causa de seu preparo simples e aplicações promissoras muita atenção tem sido dada a essa classe de produtos. Eles foram descritos pela primeira vez por Otto Bayer em 1937 e nos últimos 40 anos eles têm sido utilizados na área médica, graças à sua biocompatibilidade e a sua flexibilidade mecânica (CHERNG *et al.*, 2013).

Devido ao grande interesse que os poliuretanos apresentam, variados SLF utilizando poliuretanos biodegradáveis estão sendo desenvolvidos. Entre os exemplos destacam-se nanopartículas, nanocápsulas, microesferas, grânulos, filmes, espumas, géis e sistemas sólidos (CHERNG *et al.*, 2013).

Os elastômeros de poliuretano possuem grupos uretano formados por meio da reação entre um polioliol e um diisocianato. A estrutura geral desses polímeros é do tipo $(A - B)_n$, onde A é tipicamente um diol poliéster ou poliéter flexível de cadeia longa e é usualmente denominado de segmento macio e B é o segmento rígido, formado pela reação de diisocianatos com extensores de cadeia, que podem ser trióis ou dióis de baixa massa molar, como ácido 2,2-Bis (Hidroximetil) propiônico (DMPA), ou diaminas, como a hidrazina, dando origem a ligações uretano ou uréia respectivamente, que são altamente polares e promovem a coesão do polímero (AYRES; ORÉFICE; YOSHIDA, 2007; WANG; COOPER, 1983).

A diferença na polaridade entre esses dois segmentos torna essas regiões incompatíveis e o resultado é que eles não se misturam a um nível molecular, produzindo uma microseparação de fases de maneira a formar microdomínios (**Figura 5**). O segmento rígido proporciona rigidez e reforço para o polímero, enquanto que o macio é responsável pelo comportamento elástico e são geralmente amorfos com uma transição vítrea (T_g) abaixo da temperatura ambiente (CRAWFORD; BASS; HAAS, 1998), ou seja, esses segmentos influenciam as propriedades físicas e mecânicas dos poliuretanos e estas aumentam à medida que o grau de segregação entre os segmentos rígidos e os segmentos macios aumenta.

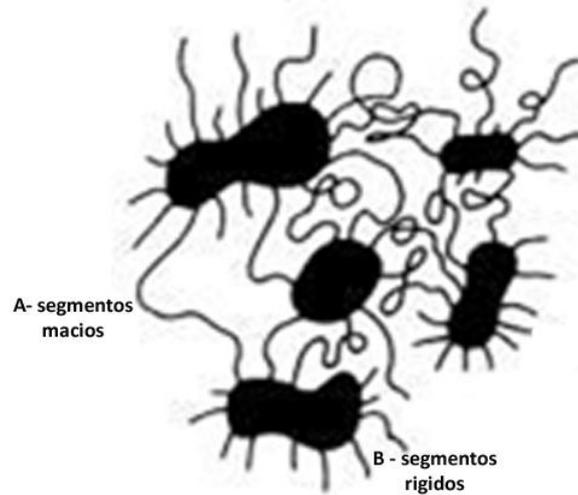


Figura 5 - Esquema das estruturas de domínios nos poliuretanos

Fonte: Adaptado de <http://www.poliuretanos.com.br/Cap1/17Correlacoes.htm>

Os poliuretanos convencionais são imiscíveis, dessa forma não podem ser dispersos em meio aquoso. Para evitar a utilização de solventes orgânicos, foram desenvolvidas dispersões de poliuretanos que apresentam a água como principal componente, sendo por isso conhecida como PUD (AYRES; ORÉFICE; YOSHIDA, 2007).

O desenvolvimento de sistemas biodegradáveis derivados de dispersões aquosas a base de poliuretano tem sido muito estudado por ser pouco agressivo ao ambiente. O aumento da demanda para minimizar componentes orgânicos voláteis e os níveis de poluentes atmosféricos perigosos têm motivado pesquisas no desenvolvimento de produtos ecologicamente corretos. A tecnologia à base de água é um processo eficaz para questões que envolvem a poluição ambiental, saúde e segurança (XIA *et al.*, 2014)

Existem diferentes estratégias para preparar dispersões de poliuretanos e muitas maneiras de incorporar grupos hidrofílicos à sua cadeia, sendo a maneira mais usual a obtenção pelo processo de pré-polímero. Nesse processo, grupos hidrofílicos são incorporados à cadeia utilizando compostos como o DMPA, cujos grupos OH participam da reação com os grupos NCO de um diisocianato, como o isocianato de isofozona (IPDI), deixando seus grupos carboxílicos pendentos na cadeia do

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

poliuretano (XIA *et al.*, 2014). Os grupos carboxílicos pendentes são estabilizados eletrostaticamente por meio da neutralização com uma amina terciária (XIA *et al.*, 2014), como a trietilamina (TEA), passando então a agir como um emulsificante, possibilitando a dispersão do poliuretano em água.

Filmes provenientes de dispersões aquosas de poliuretano já foram usados em diversas aplicações farmacêuticas tais como implantes de liberação prolongada para tratamento de doenças do segmento posterior do olho contendo dexametasona (SILVA *et al.*, 2011) e para tratamento de diferentes doenças por meio da inibição da angiogênese inflamatória com emprego de sistemas contendo triancinolona (PINTO *et al.*, 2012). Foi também desenvolvido um filme contendo bevacizumabe, o objetivo era o tratamento do glaucoma, mas a liberação foi de apenas 10% (PAULA *et al.*, 2013).

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Doenças da córnea são um problema de saúde pública e apesar dos esforços internacionais para a sua prevenção, elas prevalecem como uma das causas mais comuns de cegueira em alguns países em desenvolvimento (STEVENSON *et al.*, 2012). A neovascularização da córnea pode ser resultante de numerosas condições, como infecções, lesões, uso de lentes de contato, cirurgias, doenças auto-imunes, entre outras (STEVENSON *et al.*, 2012).

Dentre os agentes terapêuticos para o tratamento da neovascularização da córnea, destacam-se os mAbs. O mercado global de mAbs terapêuticos está em constante crescimento, em 2010 ele representava cerca de 7% do mercado farmacêutico, quantia equivalente a 43 bilhões de dólares. Em 2011 haviam 28 mAbs terapêuticos aprovados (ELVIN; COUSTON; VAN DER WALLE, 2013).

Dentre os mAbs, o bevacizumabe está entre os cinco medicamentos que detém a maior fatia do mercado (ELVIN; COUSTON; VAN DER WALLE, 2013). Ele é largamente utilizado para tratamento intraocular de diversas doenças em oftalmologia. Trabalhos recentes demonstraram que a aplicação tópica de bevacizumabe foi capaz de reduzir a angiogênese na córnea (MOISSEIEV *et al.*, 2014).

Apesar da aplicação tópica de medicamentos ser a forma de tratamento desejada para doenças no segmento anterior do olho, o medicamento é rapidamente drenado, reduzindo muito o tempo para a absorção do fármaco e a sua biodisponibilidade (URTTI, 2006). Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada para o bevacizumabe, com o intuito de diminuir a quantidade de fármaco necessária para o tratamento, minimizar ou suprimir os eventos adversos e diminuir a frequência de administração do fármaco é de grande importância.

OBJETIVO

OBJETIVO

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar um sistema de liberação prolongada, a base de poliuretano, biodegradável, de uso tópico e contendo o biofármaco bevacizumabe, para inibição da angiogênese na córnea.

4.2 Objetivos específicos

- Desenvolver sistemas biodegradáveis para liberação prolongada constituídos de poliuretano e bevacizumabe;
- Caracterizar os sistemas desenvolvidos por meio de microscopia eletrônica de varredura, análise térmica e infravermelho com transformada de Fourier;
- Avaliar a liberação *in vitro* do bevacizumabe incorporado ao sistema por técnicas de cromatografia a líquido de alta eficiência;
- Avaliar o bevacizumabe incorporado ao sistema por técnicas e eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Avaliar a viabilidade celular do sistema baseada na conversão mitocondrial do sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazólico (MTT);
- Avaliar a atividade gênica *in vivo* do sistema em modelos de membrana corioalantóica e de neovascularização em córneas de coelhos.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento de sistemas biodegradáveis constituídos de poliuretanos e bevacizumabe

5.1.1 Obtenção da dispersão aquosa de poliuretano (PUD)

A PUD foi preparada conforme metodologia descrita por Ayres, Oréfica e Yoshida (2007) e formulada para um teor em sólidos com cerca de 25% p/v (**Tabela 1**). A síntese da PUD foi realizada em um balão de três vias, onde foram adicionados a policaprolactona diol MM 1.250 - Sigma-Aldrich[®], Brasil (PCL 1250), a policaprolactona diol MM 2.000 - Sigma-Aldrich[®], Brasil (PCL 2000), o ácido 2,2 –Bis (hidroximetil) propiônico, 99% - Sigma-Aldrich[®], Brasil (DMPA) e a isoforona diisocianato - Merck Schuchardt OHG[®], Alemanha (IPDI). O balão contendo os componentes foi aquecido em uma manta aquecedora a 60 °C por 120 minutos, sob agitação mecânica a 80 rotações por minuto (RPM). Metade do catalisador dibutil dilaurato - Sigma-Aldrich[®], Brasil foi adicionado ao balão mantendo a temperatura a 60°C por 60 minutos, em seguida a segunda metade foi acrescentada mantendo todas as condições por mais 60 minutos. Para determinar a porcentagem de grupos NCO livres no pré-polímero foi usado o método de titulação com n-dibutilamina. 10 mL de n-dibutilamina foram colocados em um erlenmeyer juntamente com 10 g do pré-polímero e foram aquecidos até o início da ebulição. Após o resfriamento foi adicionado 100 mL de metanol e 2 gotas do indicador azul de bromofenol. A titulação foi realizada com ácido clorídrico, Merck KGaA[®], Brasil (HCl) 1N até a mudança de coloração de azul para amarelo leitoso. O mesmo procedimento foi realizado para o ensaio em branco. A porcentagem de NCO livre foi calculada de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ NCO} = \frac{(V_{\text{BRANCO}} - V_{\text{AMOSTRA}}) \times f \times 4,202}{\text{PESO DA AMOSTRA}} \quad (1)$$

MATERIAIS E MÉTODOS

Em que:

V_{BRANCO} = volume em mL de HCl 1N consumido na titulação de di-n-butilamina pura (sem amostra),

V_{AMOSTRA} = volume em mL de HCl 1N consumido na titulação de di-n-butilamina,

f = fator de correção da concentração de HCl 1N especificado no frasco do reagente.

Tabela 1- Formulação (% em massa) das dispersões aquosas de poliuretano

PCL 1250	PCL 2000	DMPA	IPDI	Dibutil dilaurato	TEA	Hidrazina	Água purificada
6,43	9,91	1,03	9,09	0,0025	0,77	4,81	qsp 100

O pré-polímero foi resfriado até 40 °C e a neutralização dos grupos -COOH do DMPA foi realizada com a adição de Trietilenamina - Vetec[®], Brasil, que foi calculada conforme equação 2:

$$m = n \times 101 \quad (2)$$

Em que:

m = massa de TEA,

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

101 = equivalente grama da TEA.

A preparação foi agitada por 40 minutos para assegurar que a reação fosse completa. O pré-polímero neutralizado foi então disperso pela adição de água purificada. Imediatamente após, foi adicionada a hidrazina hidrato - solução a 24% - Vetec[®], Brasil, à dispersão sob agitação mecânica de 1500 RPM a uma temperatura constante de 40 °C e a agitação foi mantida por 40 min para a etapa de extensão de cadeia. A quantidade de hidrazina foi calculada conforme a equação 3, levando em consideração a porcentagem de grupos -NCO residuais.

$$m = \frac{m_{pp} / 100 \times NCO_p \times 16 / 0,24 \times 1,56}{42 \times 100} \quad (3)$$

MATERIAIS E MÉTODOS

Em que:

m = massa de hidrazina (equivalente= 16g/mol e concentração de 24%),

m_{pp} = massa de pré-polímero,

NCO_p = % de NCO obtido na titulação conforme método descrito,

1,56 é o fator de correção para o hidrato,

42 é o equivalente-grama do grupamento NCO.

A Figura 6 mostra as etapas da síntese da dispersão do poliuretano em água.

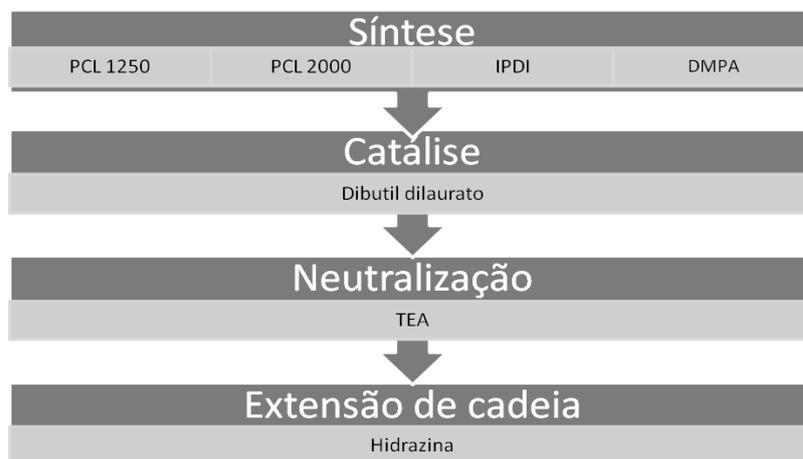


Figura 6 – Etapas da síntese da dispersão aquosa de poliuretano

5.1.2 Preparo dos sistemas de poliuretanos e bevacizumabe

Hidrazina foi adicionada à PUD na proporção 1:10 e a mistura foi submetida à agitação magnética por 10 minutos. Em seguida foi adicionada a solução comercial de bevacizumabe - Avastin[®] 25 mg/mL - Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Brasil, na proporção 1:3, com agitação magnética branda por 1 minuto. Com esse procedimento, a precipitação foi evitada. A dispersão foi congelada em nitrogênio líquido por 10 minutos e liofilizada em liofilizador Pirani 78/1 (Edwards) por 24 horas a -40°C.

O produto liofilizado obtido foi prensado por 1 minuto com 808,07 Newtons/cm² de pressão utilizando uma prensa hidráulica TE-098 (Tecnal). O material obtido foi cortado na forma de hastes com $5,58 \pm 0,58$ mm de comprimento e $0,57 \pm 0,03$ mm

MATERIAIS E MÉTODOS

de largura. O peso médio dos sistemas foi calculado a partir de 10 sistemas selecionados aleatoriamente. O resultado foi expresso em função da média \pm desvio padrão.

5.2 Caracterização dos sistemas desenvolvidos

Para a caracterização dos sistemas foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, análise térmica (termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial) e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.

As amostras caracterizadas foram nomeadas da seguinte maneira:

- Sistema: sistema formado pela mistura de PUD + hidrazina + solução comercial de bevacizumabe liofilizado e prensado;
- Sistema branco: sistema formado pela mistura de PUD + hidrazina + excipientes presentes na solução comercial de bevacizumabe (sem o bevacizumabe) liofilizado e prensado;
- PUD-LP: PUD liofilizada e prensada;
- Bevacizumabe-SCL: Bevacizumabe solução comercial liofilizada.

5.2.1 Análise morfológica dos sistemas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície de sistemas poliméricos tem um papel importante no seu processo de degradação e de liberação dos fármacos nele presentes. A MEV é realizada a partir de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que varre a superfície da amostra, produzindo elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores adequados e convertidos em uma imagem de vídeo, tornando possível visualizar características microestruturais de objetos sólidos com alta resolução e aparência tridimensional da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A avaliação da estrutura morfológica da superfície dos materiais, com relação à presença de poros e canais na matriz polimérica, foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura, em microscópio Inspect S50 (FEI), após

MATERIAIS E MÉTODOS

recobrimento dos sistemas com ouro. Foi também realizada uma análise morfológica comparativa entre o sistema antes e após um estudo de liberação *in vitro* por 48 horas.

5.2.2 Análises térmicas

5.2.2.1 Termogravimetria (TG)

A TG consiste na variação de massa da amostra (perda ou ganho de massa) determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de tempo e temperatura (CHEN; OAKLEY, 1995). A TG é um método adequado para avaliar as propriedades térmicas de elastômeros de poliuretano (COUTINHO; DELPECH, 2000).

A TG foi avaliada utilizando o equipamento TGA/SDTA 851A (Mettler Toledo). As amostras foram colocadas em cadinhos de alumina (Al_2O_3) e os experimentos foram conduzidos em atmosfera dinâmica de nitrogênio (fluxo de 50 mL/min). O aquecimento foi realizado da temperatura ambiente até 500 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min. Foram analisadas amostras do sistema, da PUD-LP e da Bevacizumabe-SCL;

5.2.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A DSC é uma técnica que permite avaliar as variações entálpicas que ocorrem com uma substância submetida a uma programação controlada de tempo e temperatura e possibilita obter dados de temperatura de transição vítrea, ponto de fusão, sublimação e decomposição pelo calor (CHEN; OAKLEY, 1995).

O comportamento térmico dos sistemas foi avaliado utilizando um calorímetro DSC50 (Shimadzu). Para realizar os testes, as amostras foram seladas em um cadinho de alumínio e aquecidas a partir da temperatura ambiente até 100 °C a uma

MATERIAIS E MÉTODOS

razão de aquecimento de 10°C/min, em uma atmosfera inerte de nitrogênio, seguido de uma isoterma de 10 minutos. Em seguida, a amostra foi resfriada a -100 °C e aquecida novamente a 10°C/min até 350°C. Para a análise do produto liofilizado obtido da Bevacizumabe-SCL, a amostra foi aquecida a 10°C/min até 350 °C. Foram analisadas amostras do sistema, do sistema branco, da PUD-LP e da Bevacizumabe-SCL.

5.2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para avaliar as potenciais interações entre o bevacizumabe e o polímero, os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos com emprego de um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrum One FT-IR (PerkinElmer).

As amostras foram liofilizadas e as medições foram realizadas em espectros resultantes de 4 varreduras, com uma resolução de 4 cm⁻¹, no intervalo de 4.000 a 650 cm⁻¹. As bandas entre 1700 a 1600 cm⁻¹ foram submetidas a métodos matemáticos de deconvolução para resolver bandas sobrepostas. Foram analisadas amostras da PUD-LP, do sistema antes e após o estudo de liberação, do sistema branco e da Bevacizumabe-SCL.

5.3 Metodologia analítica para análise do bevacizumabe presente no sistema por meio de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

A quantificação do estudo de liberação *in vitro* do bevacizumabe a partir dos sistemas foi realizada por CLAE, utilizando o método analítico adaptado de Gomes *et al.* (2012).

O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado foi composto por bomba LC-10ADVP, degasser DGU-12AM, auto-injetor SIL-20A, forno CTO-10A, acoplado a um detector DAD (SPD-M20A) e UV/VIS (SPD-20A) (Shimadzu). Uma coluna

MATERIAIS E MÉTODOS

cromatográfica de exclusão por tamanho SEC (do inglês, *size exclusion chromatography*), a BioSuite 250[®] HR SEC, de 7,8 mm de diâmetro e 300 mm de comprimento, com tamanho de partícula de 5 µm (Waters) foi utilizada. Esse tipo de coluna é comumente usada para a análise de proteínas, pois ela é capaz de separar biomoléculas de acordo com o seu tamanho molecular. A distribuição de tamanho ou mono-dispersidade de um mAB é importante para a segurança e eficácia desses produtos. A coluna do tipo SEC é comumente utilizada para determinar essa heterogeneidade relacionada ao tamanho (FEKETE *et al.*, 2013).

A fase móvel empregada foi tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 (**Tabela 2**), conforme definido por Gomes *et al.* (2012). As soluções de bevacizumabe foram preparadas no momento da utilização.

Tabela 2 - Composição da fase móvel

Reagentes	Porcentagens
Fosfato de sódio bibásico anidro	0,24
Fosfato de potássio monobásico anidro	0,02
Cloreto de sódio	0,8
Água purificada	q.s.p. 100

O volume de injeção de amostra foi de 20 µL, o fluxo de 1,0 mL/min e a temperatura de 25°C. As amostras foram filtradas em membrana de poro 0,45 µm (Durapore, Millipore[®]) e injetadas no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas.

Para avaliar o comprimento de onda adequado para a detecção, foi realizada uma varredura do bevacizumabe utilizando o detector DAD (do inglês - *diode array detector*) do cromatógrafo. O bevacizumabe foi diluído em tampão PBS pH 7,4 até a concentração final de 50 µg de bevacizumabe/mL, sendo a varredura programada entre 190 e 400 nm.

Em dias diferentes foram construídas e analisadas três curvas com concentrações de 2,5 (limite inferior do intervalo), 5,0, 12,5, 25,0, 50,0 e 75,0 (limite superior do intervalo) µg/mL de bevacizumabe. Cada uma dessas curvas foi preparada a partir

MATERIAIS E MÉTODOS

de uma solução estoque diferente. Todas as amostras foram diluídas em tampão PBS pH 7,4 até a concentração final desejada.

A especificidade do método foi testada analisando-se todos os componentes existentes na Bevacizumabe-SCL com exceção do anticorpo bevacizumabe. Para tal, foi preparada uma solução placebo baseada na formulação: 6,0% de trealose, 0,58% de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 0,12% de fosfato de sódio anidro dibásico e 0,04% de polissorbato 20 (FDA, 2013).

Foi analisada uma amostra da fase móvel e da solução tampão PBS pH 7,4 utilizada nos estudos de liberação. Foi analisado também o meio proveniente da incubação do sistema branco em PBS nas mesmas condições do estudo de liberação: tampão PBS pH 7,4, 37 °C a 30 RPM, por 24 horas.

Para avaliação do placebo fortificado, o sistema branco foi incubado em PBS nas mesmas condições do estudo de liberação: tampão PBS pH 7,4 a 37 °C a 30 RPM, por 24 horas. Uma quantidade de bevacizumabe equivalente à que estaria no sistema foi acrescentada no meio após a incubação para analisar se o material degradado do sistema poderia interferir na quantificação do bevacizumabe.

5.4 Avaliação da estabilidade do bevacizumabe por meio de CLAE

Com o objetivo de conhecer melhor a estabilidade do anticorpo, a solução comercial de bevacizumabe foi avaliada nas condições descritas abaixo e analisada por CLAE. A estabilidade térmica do bevacizumabe foi avaliada nas temperaturas de -80°C e -20 °C por um período de 4 dias. Cada condição foi avaliada em 3 lotes diferentes.

Para simular a condição de transporte por pequenas empresas, amostras de 3 lotes diferentes foram conservadas por 4 dias em caixas de isopor contendo bolsas térmicas de gel, esse período foi suficiente para a temperatura dentro do isopor se igualar à ambiente. A estabilidade do bevacizumabe foi avaliada em seguida.

MATERIAIS E MÉTODOS

A solução comercial de bevacizumabe foi avaliada após ser diluída em tampão PBS pH 7,4 a uma concentração de 50 µg/µL e armazenada por 2 semanas em 3 condições diferentes: 4°C, temperatura ambiente e após incubação nas mesmas condições que o estudo de liberação (37°C/30RPM).

Na busca de um solvente para o sistema que não provoque a degradação do bevacizumabe e possibilite a quantificação do bevacizumabe dentro do sistema, a solução comercial de bevacizumabe foi misturada na proporção 1:1 com cada um dos reagentes a seguir: acetonitrila, metanol e trizol. Outro teste foi realizado diluindo o trizol em PBS 1:1 e então adicionando o bevacizumabe na proporção 8:1. O bevacizumabe foi analisado após a mistura com os reagentes.

A solução comercial de bevacizumabe foi liofilizada sob as mesmas condições do sistema, diluída em tampão PBS pH 7,4 e analisada para avaliar o impacto da liofilização na molécula do anticorpo.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., EUA). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão relativo. Para comparações entre tratamentos, foi realizada análise estatística por ANOVA seguida do teste de comparação múltipla Bonferroni, onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.5 Estudo de liberação *in vitro* do bevacizumabe a partir dos sistemas

O estudo de liberação *in vitro* do bevacizumabe a partir dos sistemas foi realizado em incubadora MaxQ 7000 (Barnstead International) a 30 RPM e 37 °C. Os sistemas ($n = 6$) contendo cerca de 120 µg de bevacizumabe foram colocados em microtubos contendo 1 mL de solução tampão PBS pH 7,4. Em intervalos de 24 horas, no período de 1 semana o meio de cada microtubo foi totalmente coletado, substituído e a concentração de bevacizumabe liberada foi analisada por CLAE. Foi realizada análise estatística por ANOVA seguida do teste de comparação múltipla Bonferroni, onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

5.6 Estudo de degradação *in vitro* dos sistemas

A determinação da porcentagem de perda de massa do sistema ao longo do estudo de degradação *in vitro* foi utilizada para acompanhar o perfil de degradação do sistema e entender os processos de degradação do polímero e liberação do bevacizumabe.

O estudo de degradação *in vitro* do bevacizumabe a partir dos sistemas foi realizado em incubadora MaxQ 7000 (Barnstead International), a 30 RPM e 37 °C. Os sistemas com fármaco (n = 6) foram colocados em microtubos contendo 1 mL de solução tampão PBS pH 7,4. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, os sistemas foram removidos e secos por 40 minutos em estufa a 40°C com o objetivo de determinar a perda de massa proveniente do bevacizumabe ou do polímero. A perda de massa foi calculada por meio da equação 4. Os resultados obtidos foram expressos como sendo a média \pm desvio padrão relativo.

$$\text{Perda de massa (\%)} = m_f \times 100 / m_0 \quad (4)$$

Em que:

m_f = massa final do poliuretano no intervalo de tempo pré-estabelecido,

m_0 = massa inicial do poliuretano.

Um gráfico relacionando a perda de massa e tempo foi construído, cujos dados foram apresentados como porcentagem de perda de massa em relação à massa total do sistema sólido.

5.7 Avaliação *in vitro* da viabilidade celular pela redução do MTT

O tecido epitelial que protege a córnea age como a principal barreira contra infecções no olho. Devido à função de proteção, provavelmente esse tipo celular apresenta um alto grau de resistência e poderia não apresentar boa sensibilidade no estudo de toxicidade. Para contornar esse problema, a viabilidade celular foi realizada em células de Müller humanas, que abrangem toda a espessura da retina

MATERIAIS E MÉTODOS

neural (segmento posterior do olho), estendendo da superfície do vítreo até o espaço sub-retinal.

A viabilidade das células Müller humanas, espontaneamente imortalizadas (Mio-M1), foi determinada por meio da dosagem colorimétrica baseada na conversão mitocondrial do sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazólico (MTT). Para a condução do ensaio foram cultivadas células Mio-M1, em meio DMEM com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e incubado a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As células Mio-M1 foram semeadas na concentração de 10.000 células/poço em placas de poliestireno de 96 poços e colocadas em uma estufa para crescimento celular, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera citadas acima. Após 96 horas o meio foi retirado da placa e lavado com 200 µl/poço de PBS 1X.

Amostras do sistema, do sistema branco, da PUD-LP, da PUD + hidrazina (na mesma proporção da utilizada no sistema) todas liofilizadas e prensadas e da solução comercial de bevacizumabe foram colocadas em PBS pH 7,4 e incubadas por 4 semanas a 100 RPM de agitação e 37°C em uma incubadora (Gallenkamp). Considerando que as células de Müller estão localizadas no segmento posterior do olho, a concentração de cada amostra nos poços foi testada considerando a proporção de 01 e de 02 sistemas implantado no vítreo (considerando um volume de 4 mL para o vítreo). A concentração da solução de bevacizumabe foi calculada considerando a quantidade liberada pelo sistema conforme análise de CLAE (45,26%). Em cada poço foram colocados 18 µL do meio após a incubação e 182 µL do meio DMEM com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado.

Os sistemas foram pesados antes e após o período de incubação para avaliar a perda de peso. O estudo foi realizado em duplicata e cada um foi composto por oito replicatas. As placas foram incubadas novamente nas mesmas condições que a descrita para o crescimento celular. Após 72 horas o meio foi retirado, lavado com PBS 1X (200 µl/poço) e aplicado 100 µl/poço de MTT. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após esse período foram colocadas na centrífuga a 1000 RPM

MATERIAIS E MÉTODOS

por 10 minutos para a precipitação do formazan. O meio com MTT foi aspirado e foram adicionados 150µl de isopropanol para solubilizar o formazan. Para avaliação da viabilidade celular a leitura foi realizada em um leitor de microplacas (BioRad) e os valores de absorbância foram medidos a 570 nm versus 630 nm (RISS *et al.*, 2004).

A viabilidade celular foi calculada utilizando a equação 5. Os resultados obtidos foram expressos como sendo a média \pm desvio padrão relativo.

$$\text{Viabilidade} = \frac{(\text{média dos valores de absorbância do tratamento})}{(\text{média dos valores de absorbância do controle})} \times 100\% \quad (5)$$

5.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)

A avaliação do perfil do bevacizumabe foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970), com o objetivo de detectar agregados proteicos de alta massa molecular ou moléculas menores provenientes de clivagem da molécula.

Amostras do sistema, do sistema branco e da solução comercial de bevacizumabe (controle positivo) foram diluídas em tampão PBS até a concentração de 0,8 µg/µL (considerando a quantidade de bevacizumabe liberada em 24 horas no estudo de liberação *in vitro*) e incubadas por 24 horas a 37°C/30 RPM. As amostras preparadas e uma solução de bevacizumabe preparada da mesma maneira no momento da aplicação foram diluídas em tampão de amostra (25,0% de tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 20,0% de glicerol; 40,0% de SDS 10%; 5,0% de azul de bromofenol 0,8% e 10,0 % de água deionizada). A seguir foram incubadas em banho-maria a 95°C por 3 minutos.

Os componentes do gel foram preparados segundo Laemmli (1970) em duas fases, chamadas de sistema descontínuo, que consiste de géis de aplicação e separação. A concentração do gel de aplicação foi de 4% e a do gel de separação de 7,5% (**Tabela 3**).

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3 - Composição dos géis de concentração e separação

Componentes	Gel de aplicação (4%)	Gel de separação (7,5%)
Acrilamida-Bis 30 %	0,65 mL	1,25 mL
Tris 1,5 M (pH 8,8)	-----	1,25 mL
Tris 0,5 M (pH 6,8)	1,25 mL	-----
SDS 10 %	0,05 mL	0,05 mL
Água	3,05 mL	2,43 mL
PSA 10%	35 µL	35 µL
TEMED	14 µL	14 µL

As amostras foram aplicadas nas canaletas e os géis foram submetidos a uma diferença de potencial de 200 V, 400 mA por 70 minutos em tampão de corrida (1,5% tris-base, 7,2% glicina, 0,5% SDS e 90,8% água deionizada).

Após o término da corrida, o gel obtido foi corado pelo método de nitrato de prata. Para isso o gel foi fixado com solução composta por 30% metanol, 10% ácido acético e 60% de água. Foi lavado e colocado em solução de $K_2Cr_2O_7$ (0,1% $K_2Cr_2O_7$; 0,028% HNO_3) por 5 minutos e lavado 2 vezes com água por 5 minutos com agitação. A membrana foi então colocada em solução de $AgNO_3$ 0,2% sob leve agitação por 20 minutos e em seguida lavada com água. As bandas foram reveladas após a adição de NaOH 3,0% e a reação foi interrompida com ácido acético 1,0%.

5.9 Avaliação da angiogênese utilizando o modelo da membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)

Uma vez que a angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, o bevacizumabe, um inibidor da angiogênese, age nesse processo (GERBER; FERRARA, 2005). Optou-se então por utilizar o ensaio da CAM, que é um método *in vivo* muito utilizado para estudar tanto a angiogênese quanto a antiangiogênese (STATON *et al.*, 2004). O estudo foi realizado utilizando a metodologia adaptada de Burt *et al.* (1995).

MATERIAIS E MÉTODOS

Ovos embrionados foram incubados à temperatura de 37°C e 60% de umidade relativa do ar, na posição horizontal e rotação constante, utilizando uma chocadeira do tipo incubadora automática digital (Premium Ecológica). No 3° dia de desenvolvimento embrionário, foi realizada uma abertura circular de aproximadamente 2,0 cm de diâmetro na casca do ovo, na região da câmara de ar. Em seguida a membrana interna da casca foi retirada para a exposição da membrana corioalantóica. Os ovos foram selados com fita adesiva transparente e mantidos na posição vertical na incubadora. No 5° dia de desenvolvimento os tratamentos foram aplicados e imediatamente após, foram colocados discos de celulose de tamanho padronizado sobre a CAM.

Os sistemas foram submetidos a uma situação semelhante ao do estudo de liberação, onde foram colocados em solução tampão PBS pH 7,4 e incubados a 37°C/30 RPM por 05 dias, para que o fármaco fosse liberado na solução e uma alíquota fosse aplicada sobre a CAM.

Ovos embrionados foram aleatoriamente divididos em três grupos (n=14 para cada grupo): controle negativo (30 ul de tampão PBS, pH 7,4), controle positivo (30 ul de solução comercial de bevacizumabe diluída para quantidade equivalente a 275 µg de bevacizumabe/mL) e o tratamento (30 ul do meio proveniente da incubação dos sistemas por 24 horas em PBS a 30 RPM – o conteúdo total de bevacizumabe no sistema, caso ocorresse a liberação total, proporcionaria uma concentração de 275 µg em 1 mL do meio).

No 7° dia de incubação, foi realizada a extração das CAMs após prévia fixação com solução de formaldeído a 3,7% por 10 minutos. As CAMs foram fotografadas com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio Q766P/L/ZL (Motic) equipado com uma câmera Moticom 2300, Q715CVD-2300-0-0 (Motic), sendo as imagens capturadas pelo *software* Images Plus 2.0 (Motic), com um aumento padronizado de 20X. As imagens obtidas foram processadas com o auxílio do programa ImageJ versão 1.44 (National Institutes of Health).

A resposta foi mensurada em função da área (pixels) relativa aos vasos sanguíneos em relação ao grupo controle negativo (CN), que foi fixado em 100% para o cálculo

MATERIAIS E MÉTODOS

da redução dos vasos sanguíneos. Os resultados foram expressos como percentual de vasos sanguíneos (média) \pm desvio padrão relativo. Foi realizada análise estatística por ANOVA seguida do teste de comparação múltipla Bonferroni, onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.10 Avaliação da atividade *in vivo* do sistema em modelo animal

5.10.1 Animais

Foram utilizadas vinte e quatro fêmeas de coelhos brancos da raça New Zealand pesando entre 2 e 3 kg com 10 a 12 semanas de idade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Ezequiel Dias (protocolo 033/2012). Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para pesquisa oftálmica envolvendo animais.

5.10.2 A indução da neovascularização

A neovascularização da córnea foi induzida por queimadura alcalina de acordo com o procedimento previamente descrito por Yourek *et al.* (2008) com algumas modificações.

Antes da indução, os coelhos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de 50 mg/kg de cloridrato de ketamina - Dopalen[®] 100 mg de ketamina/mL - Ceva, Brasil, e 15 mg/kg de cloridrato de xilazina - 20 mg de xilazina/mL - Anasedan[®] - Ceva, Brasil. A anestesia local foi obtida com 1 gota de cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% - Anestésico – Allergan, Brasil, associada à fenilefrina 0,1% antes da manipulação.

Um disco de papel filtro com 4 mm de diâmetro foi colocado em hidróxido de sódio (NaOH) 1 M por 60 segundos. O excesso de solução alcalina foi removido e o disco

MATERIAIS E MÉTODOS

foi colocado sobre a superfície da córnea de coelhos anestesiados por 40 segundos. Após a sua remoção, a superfície foi cuidadosamente lavada com 20 ml de solução salina.

5.10.3 Avaliação da indução da neovascularização

A indução da neovascularização na córnea foi confirmada por inspeção ocular, exame de biomicroscopia com lâmpada de fenda e termografia infravermelha.

A termografia infravermelha foi utilizada como um método complementar de determinação indireta da vascularização avaliando a temperatura na superfície ocular. Nesse estudo, uma câmara de termografia P640 (ThermaCAM) foi usada e os parâmetros considerados foram: emissividade 0,95, temperatura refletida de 50°C, temperatura atmosférica de 20°C, umidade relativa do ar de 50% e a distância entre o equipamento e a amostra foi de 0,5 m.

A análise comparativa ocorreu com base nas imagens de termografia (**Figura 7B**), registradas a partir de olhos de cada coelho (**Figura 7A**), antes e depois de 24 horas da indução da angiogênese. Para calcular a temperatura da superfície ocular, a córnea dos coelhos foi mapeada (**Figura 7C**), traçando linhas perpendiculares, utilizando o software QuickReport 1.2 SP2 (FLIR Systems) e o cálculo foi realizado com base na média aritmética de todos os pontos de temperatura de cada linha.

Foram construídos gráficos 3D utilizando o programa Microsoft Excel (**Figura 7D**) para facilitar a visualização e interpretação dos dados. As cores representam a variação das temperaturas registradas (lado direito do termograma e do mapa em 3D).

MATERIAIS E MÉTODOS

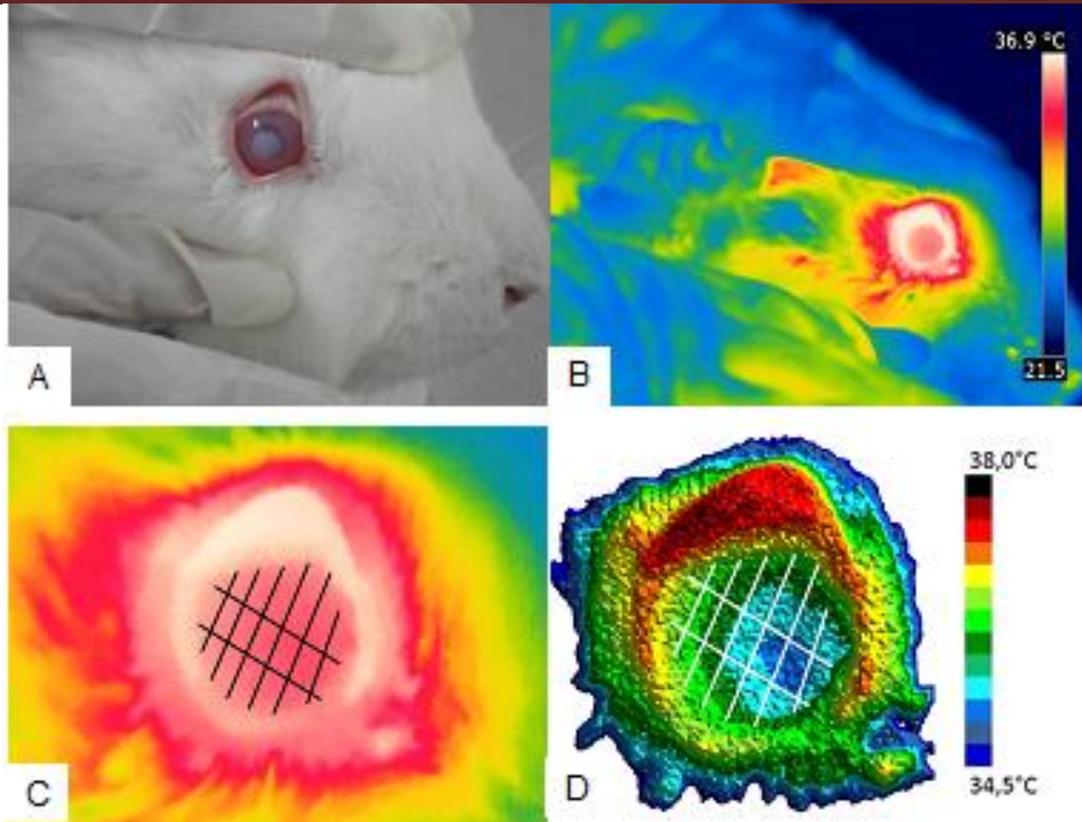


Figura 7 - Aplicação de termografia para confirmar a indução da angiogênese. Visualização da indução da angiogênese no olho do coelho (A), termograma do olho do coelho (B), representação gráfica das temperaturas (C) e mapa de superfície 3D de temperaturas (D).

5.10.4 Protocolo de tratamento

Um dia após a lesão causada pela indução da neovascularização, os coelhos foram divididos aleatoriamente em três grupos. No grupo do controle negativo, os coelhos receberam 10 ul de PBS cinco vezes durante o dia e no do controle positivo eles receberam 10 ul de solução comercial de bevacizumabe (equivalente a 250 μ g de bevacizumabe) cinco vezes ao dia. O outro grupo de coelhos foi tratado com o sistema contendo o equivalente a 70 μ g de fármaco. Todas as amostras foram aplicadas no fundo do saco conjuntival inferior do olho direito de cada coelho.

MATERIAIS E MÉTODOS

5.10.5 Avaliação clínica

O exame clínico foi realizado para avaliar o aspecto geral dos olhos tratados, a toxicidade local e a tolerância do sistema desenvolvido e incluiu inspeção ocular e biomicroscopia com lâmpada de fenda (SL 15 – Kowa) das pálpebras, conjuntiva, córnea e íris antes e diariamente após a indução de neovascularização até o 5º dia.

Os sinais clínicos de hiperemia conjuntival, edema da córnea e da íris, foram pontuadas numa escala de 0 a 3 onde 0 é sem problema, 1 é discreto, 2 é moderado e 3 é intenso.

5.10.6 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

A avaliação da vascularização foi realizada por determinação do número de vasos em seções coradas com hematoxilina-eosina (HE) ou pela pesquisa do Fator VIII através de análise imuno-histoquímica. O Factor VIII, também conhecido como fator de Von Willebrand, é sintetizado por células endoteliais e megacariócitos e a sua função é mediar a adesão das plaquetas às paredes dos vasos lesionados. A detecção imuno-histoquímica desse fator tem sido amplamente utilizado em estudos experimentais para quantificar os neovascularização do tumor em modelos animais (WANG *et al.*, 2008).

Os tecidos dos olhos dos coelhos dos grupos tratamento (sistema), controle negativo (PBS) e controle positivo (solução comercial de bevacizumabe) foram fixados em formalina (10% p/v em PBS, pH 7,4). Secções de 4 µm das amostras foram processadas para análise ao microscópio óptico. A coloração foi realizada em secções embebidas de parafina montadas em lâminas de vidro. A avaliação da vascularização foi realizada por meio da determinação do número de vasos em áreas com maior densidade microvascular (DMV), designadas como *hot spot* (áreas quentes) por meio de coloração HE e Fator VIII, de acordo com o método descrito por Maeda *et al.* (1995).

MATERIAIS E MÉTODOS

No procedimento imuno-histoquímico, realizado para avaliar a expressão de VEGF, foi realizada a técnica de reação biotina-peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (ADVANCE HRP – ready to use – DakoCytomation) e a atividade da peroxidase foi revelada utilizando diaminobenzidina (DAB- Dako).

A avaliação do VEGF levou em conta a intensidade da cor, de acordo com a seguinte escala: (0) ausência total de expressão imuno-histoquímica, (+) expressão discreta, (+ +) expressão moderada, (+ + +) expressão forte, foram analisados 10 campos de cada seção.

Os procedimentos acima descritos de avaliação histopatológica e imuno-histoquímica foram fornecidos pelo Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento de sistemas biodegradáveis constituídos de poliuretanos e bevacizumabe

Nesse trabalho, foi utilizada a PUD desenvolvida por Ayres, Oréfica e Yoshida (2007) para incorporar o anticorpo bevacizumabe. Embora esse poliuretano já tenha sido aplicado na produção de SLFs (SILVA *et al.*, 2011), ainda foi pouco utilizado para incorporar biofármacos (CHERNG *et al.*, 2013).

A PUD possibilita a produção de sistemas sem a necessidade de utilizar solventes orgânicos, nem altas temperaturas no processo e os sistemas podem ser produzidos com leve agitação após a incorporação do fármaco.

A tentativa de adicionar o bevacizumabe diretamente à PUD foi frustrada, pois ocorreu formação de precipitado visível. Com o objetivo de impedir a formação do precipitado, foi adicionada hidrazina à PUD na proporção 1:10 e a mistura foi submetida à agitação magnética por 10 minutos. A formação do precipitado pode ser evitada pela elevação de pH da mistura, dessa maneira a hidrazina foi importante por ter um bom poder tamponante.

A liofilização foi importante no processo de incorporação do bevacizumabe à PUD, por se tratar de um processo realizado a frio, diferindo dos processos comumente aplicados para o preparo de sistemas de liberação, nos quais o ativo frequentemente é exposto ao calor ou a longos períodos a temperatura ambiente (PAULA *et al.*, 2013; PEREZ *et al.*, 2012). Outra vantagem foi tornar o processo mais rápido, reduzindo o tempo de secagem para 24 horas, já que o tempo de secagem médio de sistemas preparados com a PUD submetidos à secagem a temperatura ambiente são de sete dias (PAULA *et al.*, 2013).

Com a secagem rápida, a água é liberada mais rapidamente do sistema, reduzindo possíveis perda de estabilidade por hidrólise, pois a possibilidade desse tipo de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

reação ocorrer é menor em formulações no estado sólido que em formulações líquidas.

O produto liofilizado foi prensado e as pastilhas produzidas (**Figura 8A**) foram cortadas e pesadas. O peso médio encontrado para os sistemas desenvolvidos (**Figura 8B**) foi de $0,84 \pm 0,04$ mg.

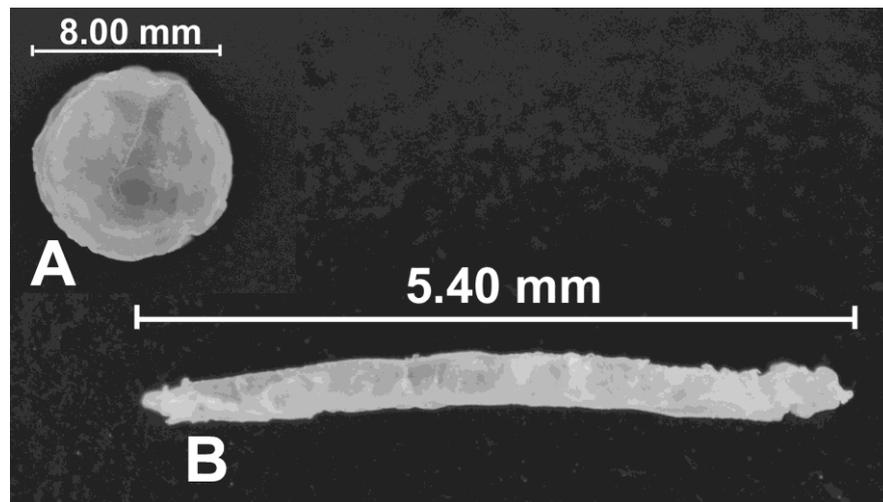


Figura 8 - Fotografia da pastilha formada após a etapa de prensagem (A) e no formato do sistema (B)

6.2 Caracterização dos sistemas desenvolvidos

6.2.1 Análise morfológica dos sistemas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O aspecto do sistema obtido apresentou superfície lisa e homogênea (**Figura 9**).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

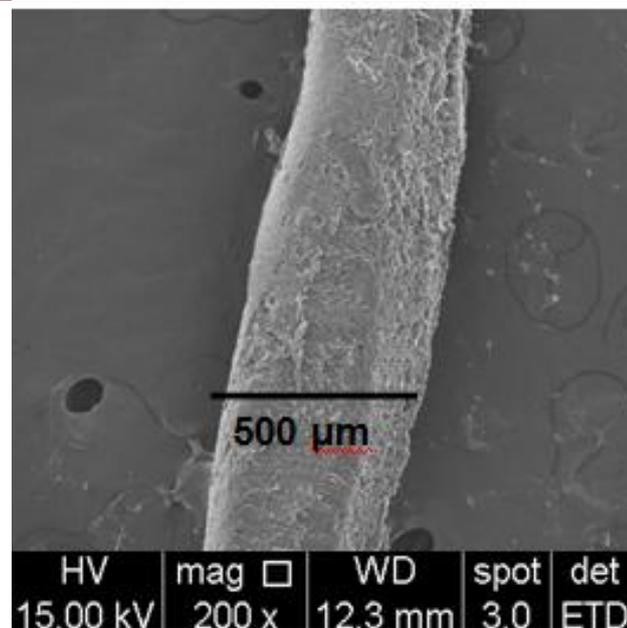


Figura 9 - Micrografia de amostras da superfície do sistema em aumento de 200 vezes.

A morfologia da superfície dos sistemas contendo o fármaco, analisada antes e após 02 dias de incubação em PBS (**Figura 10A e 10B**), apresentou irregularidades que não foram observadas antes da incubação, devido provavelmente à grande porcentagem de fármaco e excipientes da solução comercial de Bevacizumabe liberados nesse período.

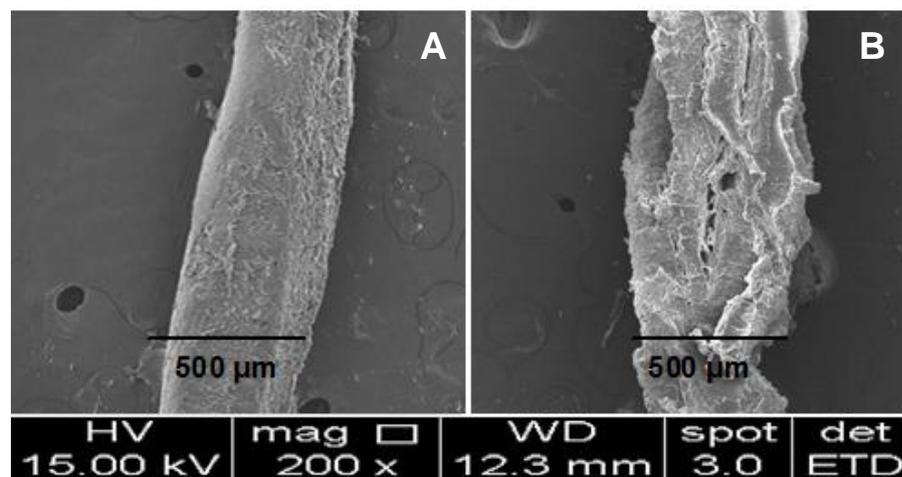


Figura 10 - Micrografias de amostras da superfície dos sistemas contendo bevacizumabe antes (A) e após 2 dias (B) de incubação em tampão PBS em aumento de 200 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.2 Termogravimetria

A TG nos permite avaliar a estabilidade do poliuretano frente ao processo de liofilização e prensagem. A PUD foi submetida ao mesmo processo de preparo do sistema, sendo assim liofilizada e prensada. Como pode ser observado na **Figura 11**, a temperatura *on-set* (T_{onset}) do primeiro estágio de degradação foi em torno de 220°C. Esta temperatura está de acordo com a relatada por Coutinho e Delpech (2000), que prepararam um filme de poliuretano que não foi liofilizado e nem prensado e embora o processo de preparo tenha sido bem diferente eles observaram que a T_{onset} ocorreu em torno de 220°C e esse evento foi associado à degradação dos segmentos rígidos, ou seja, a perda de peso ocorreu devido à degradação dos grupos ureia e/ou uretano. A temperatura máxima de degradação em torno de 370°C também foi observada por esses autores no mesmo trabalho. O segundo estágio de degradação ocorreu em torno de 430°C e segundo Coutinho e Delpech (2000) ela está relacionada com a proporção de segmento macio, sendo a temperatura mais elevada quando ele está presente em proporções maiores. Baseado nessas observações, as etapas de liofilização e prensagem não provocaram grandes alterações em eventos térmicos característicos dos poliuretanos.

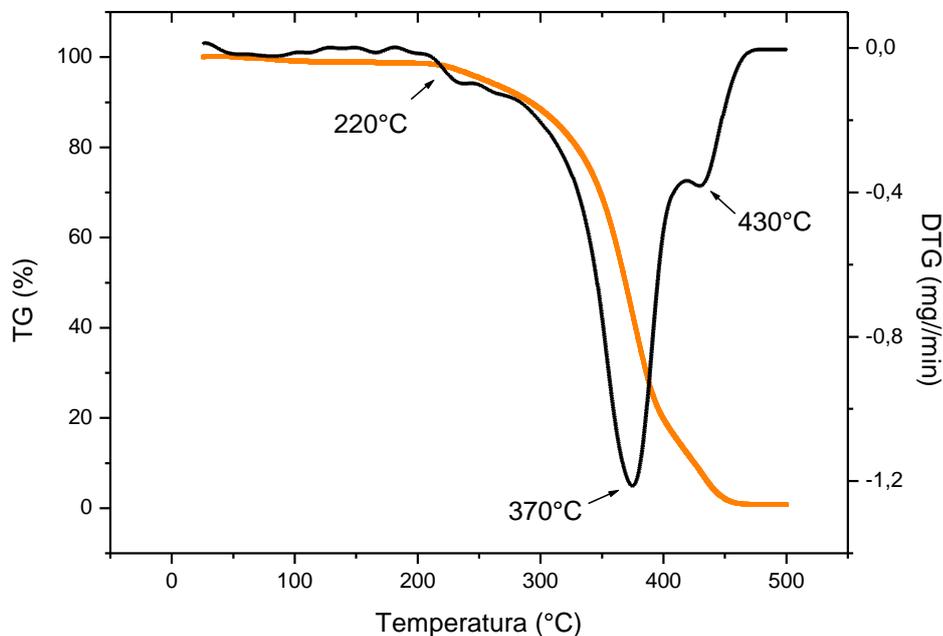


Figura 11 - Curvas TG (em preto) e DTG (em laranja) da PUD-LP

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura existem estudos que avaliam a estabilidade térmica de anticorpos utilizando DSC, contudo não foram encontradas análises de TG do bevacizumabe e nem de anticorpos do tipo IgG-1. Porém Venturelli *et al.* (2011) observaram a TG de nanotubos de carbono contendo um anticorpo monoclonal humanizado do tipo IgG-4, mas eles não apresentaram a TG do anticorpo sozinho, somente juntamente com as formulações.

Conforme pode ser observado na **Figura 12**, o sistema melhorou a estabilidade do bevacizumabe, reduzindo a perda de massa com o aumento da temperatura.

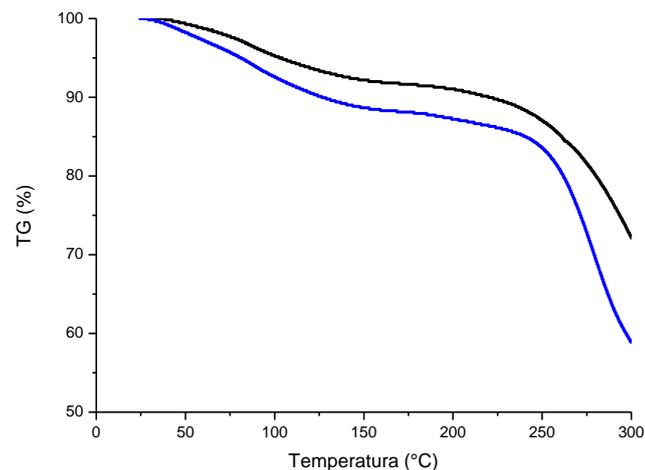


Figura 12 - Curvas TG do sistema contendo o sistema (preto) e a Bevacizumabe-SCL (azul)

6.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na curva de DSC referente à Bevacizumabe-SCL (**Figura 13**) não foi possível visualizar as transições vítreas do bevacizumabe em torno de 71°C e 83°C correspondente à fusão da porção do fragmento Fab e Fc respectivamente, conforme foi relatado por Ionescu *et al.* (2008) que avaliaram o bevacizumabe em solução.

A DSC é o método mais utilizado para a determinação da Tg, que é um parâmetro considerado de grande importância para avaliar a estabilidade dos anticorpos. Porém no método adotado para análise da Bevacizumabe-SCL não foi possível

RESULTADOS E DISCUSSÃO

detectar a Tg. No entanto Wang (2000) relatou em um trabalho científico as dificuldades de detectar a Tg de proteínas em formulações.

Tian, Sane e Rytting (2006) avaliaram por DSC a interação de um anticorpo com alguns aminoácidos que foram misturados e liofilizados. Tais autores visualizaram apenas os picos dos aminoácidos colocados na mistura, pois eles também não detectaram o pico do anticorpo, indicando que não é raro a dificuldade em detectar pico para o anticorpo como ocorreu na análise da Bevacizumabe-SCL.

O evento térmico com t_{onset} de aproximadamente 125 °C observado na DSC da Bevacizumabe-SCL (**Figura 13**) pode ser atribuído à degradação do polissorbato 20, que é um componente da sua formulação. Essa substância apresenta ponto de fulgor de 149°C (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006), mas a diferença pode ser devido à formulação e/ou à liofilização.

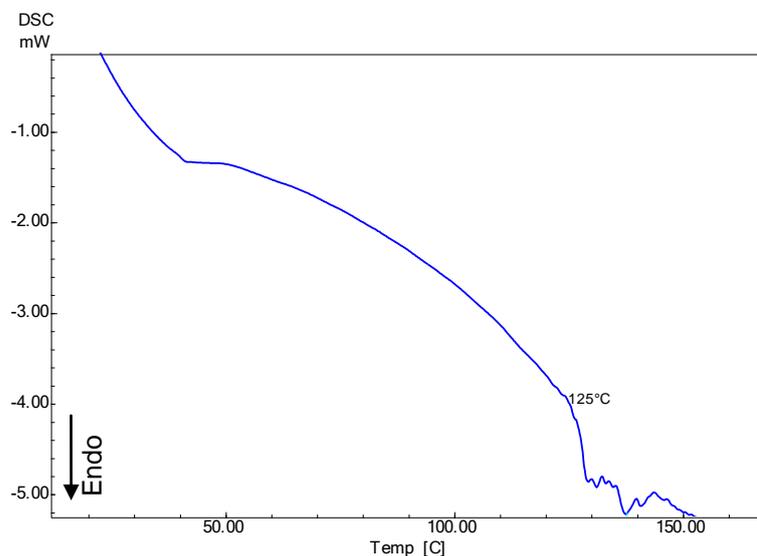


Figura 13 - Curva de DSC da Bevacizumabe-SCL

Comparando as curvas de DSC da segunda varredura da PUD-LP e do sistema (**Figura 14**) foi possível observar que embora os eventos endotérmicos ocorridos em torno de 40°C tenham sido próximos, existe uma antecipação dos eventos térmicos do sistema (38 °C) quando comparado com os da PUD-LP (44 °C). Porém avaliando os eventos térmicos do sistema branco foi possível observar que parte da antecipação não foi devido exclusivamente ao anticorpo bevacizumabe, mas sim aos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

demais componentes da solução comercial de bevacizumabe, pois o sistema branco apresentou um evento térmico intermediário (41°C). Em 67°C ocorreu um evento endotérmico, atribuído à T_g da mistura dos segmentos macios e rígidos, que não foi evidenciado após a incorporação da solução comercial de bevacizumabe, não sendo observado no sistema e nem no sistema branco. Esse resultado sugere que os domínios rígidos e macios estão mais segregados e que de alguma forma a presença da solução comercial de bevacizumabe contribuiu para que a amostra apresentasse uma morfologia de separação de fases mais acentuada que antes da incorporação. Ocorreu antecipação no evento térmico da PUD-LP a 95°C, que provavelmente é relacionado à T_g dos segmentos rígidos, para 91°C no sistema, enquanto que no sistema branco ocorreu a 97°C. Esse fenômeno de antecipação pode ter ocorrido devido à incorporação da solução comercial de bevacizumabe nas cadeias poliméricas do poliuretano, aumentando a mobilidade dessas cadeias.

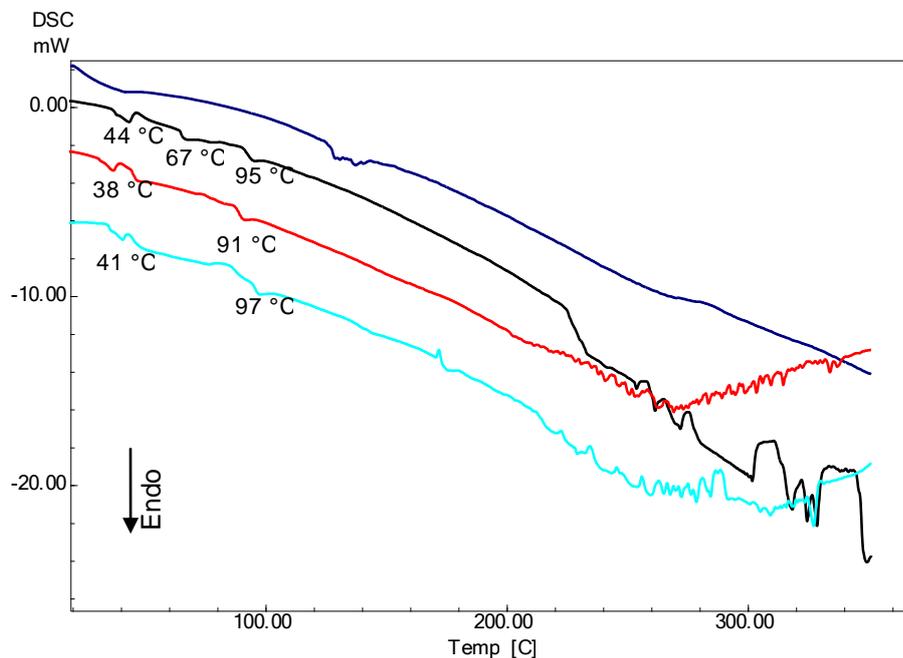


Figura 14 - Curvas de DSC referente a amostra da Bevacizumabe-SCL (azul escuro) e ao segundo aquecimento das amostras da PUD-LP (preto), do sistema (vermelho) e do sistema branco (azul claro) todos liofilizados e prensados.

Os resultados obtidos sugerem que não há interação química entre o fármaco e a matriz de PUD e que parte das alterações observadas na análise de DSC foi devida aos excipientes presentes na solução comercial de bevacizumabe. Contudo os

RESULTADOS E DISCUSSÃO

eventos ocorridos foram bem discretos, sendo necessária a aplicação de outra metodologia, como o infravermelho, para esclarecer se ocorreu ou não interação entre a PUD e o bevacizumabe.

6.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Absorções típicas de poliuretanos foram detectadas no espectro FTIR da PUD-LP (Tabela 4) na região de 4000 a 650 cm^{-1} (Figura 15).

Tabela 4 - Principais bandas identificadas no espectro de FTIR para amostra de PUD

Frequência (cm^{-1})	Atribuição	Referência
3330 cm^{-1}	Estiramento N-H com ligação de hidrogênio	(CAKIC <i>et al.</i> , 2009; SIVAKUMAR <i>et al.</i> , 2012)
2946 cm^{-1}	Estiramento CH ₂ alifático	(SIVAKUMAR <i>et al.</i> , 2012)
1730 cm^{-1}	Estiramento C=O que pode ser atribuído ao éster/uretano livre	(CAKIC <i>et al.</i> , 2009)
1538 cm^{-1} (1575–1480 cm^{-1})	Amida II – estiramento C-N e deformação angular N-H	(KONG; YU, 2007)
1456 cm^{-1} (1475–1450 cm^{-1})	Deformação angular CH ₂	(CAKIC <i>et al.</i> , 2009)
1365 cm^{-1} (1395–1365 cm^{-1})	Deformação angular CH ₃	(CAKIC <i>et al.</i> , 2009)
1230 cm^{-1}	Vibrações de C-O para ligação uretano -NHCOO-	(CHIA-WEI; LU, 2012)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

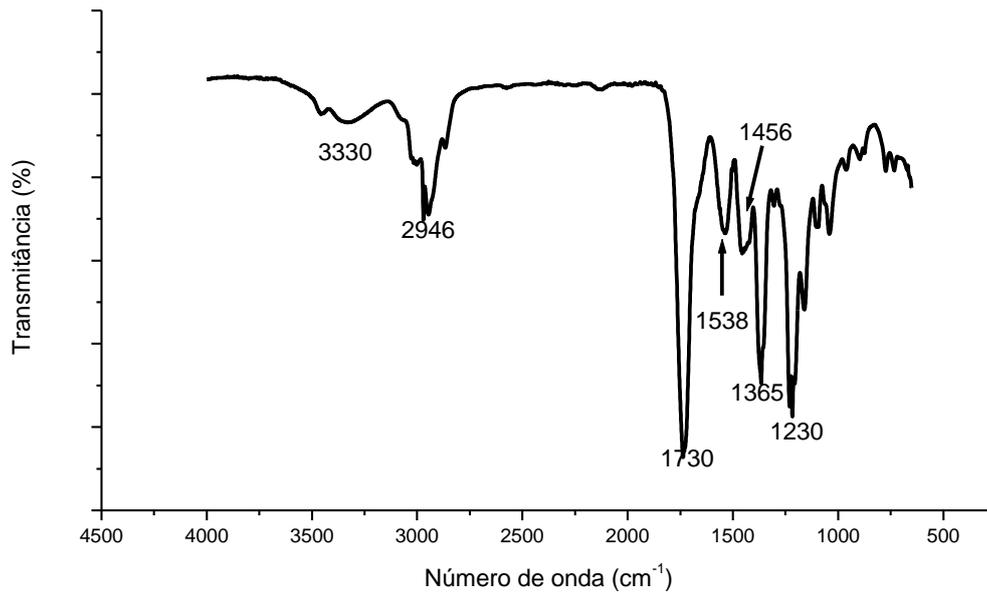


Figura 15 - Espectro de FTIR PUD-LP

A ausência de algumas bandas (**Figura 15**) demonstrou também o sucesso da síntese, como a banda a 2270 cm^{-1} , que confirma que não existem grupos NCO que não reagiram (ATHAWALE; KULKARNI, 2010). A banda em torno de 3550 cm^{-1} , correspondente ao estiramento de grupos N-H livre (amina livre), não foi observada. Existe somente um pequeno sinal a 3450 cm^{-1} , que é característica de poliuretanos e é correspondente à grupos N-H, afetado por ligações de hidrogênio entre segmento rígido e macio, indicando mistura de fases (WEN *et al.*, 1999).

As bandas na região 3330 e 3270 cm^{-1} (**Figura 16**) foram úteis apenas para caracterizar a PUD-LP, embora elas existam em todas as amostras analisadas, bandas nessa região são provenientes do estiramento NH com ligação de hidrogênio, existindo tanto na PUD-LP quanto na amida existente em anticorpos. Essa banda de vibração da amida é considerada muito complexa em se tratando de anticorpos, dependendo de pormenores do campo de força, natureza das cadeias laterais e da ligação de hidrogênio, que, por conseguinte, são de pouca utilidade prática nos estudos conformacionais dos anticorpos (KONG; YU, 2007). Nenhuma afirmação será realizada baseado nessa banda, pois além dela ser de alta complexidade, o sistema branco apresenta essa banda com alta intensidade, indicando a presença de outros componentes que absorvem na mesma banda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

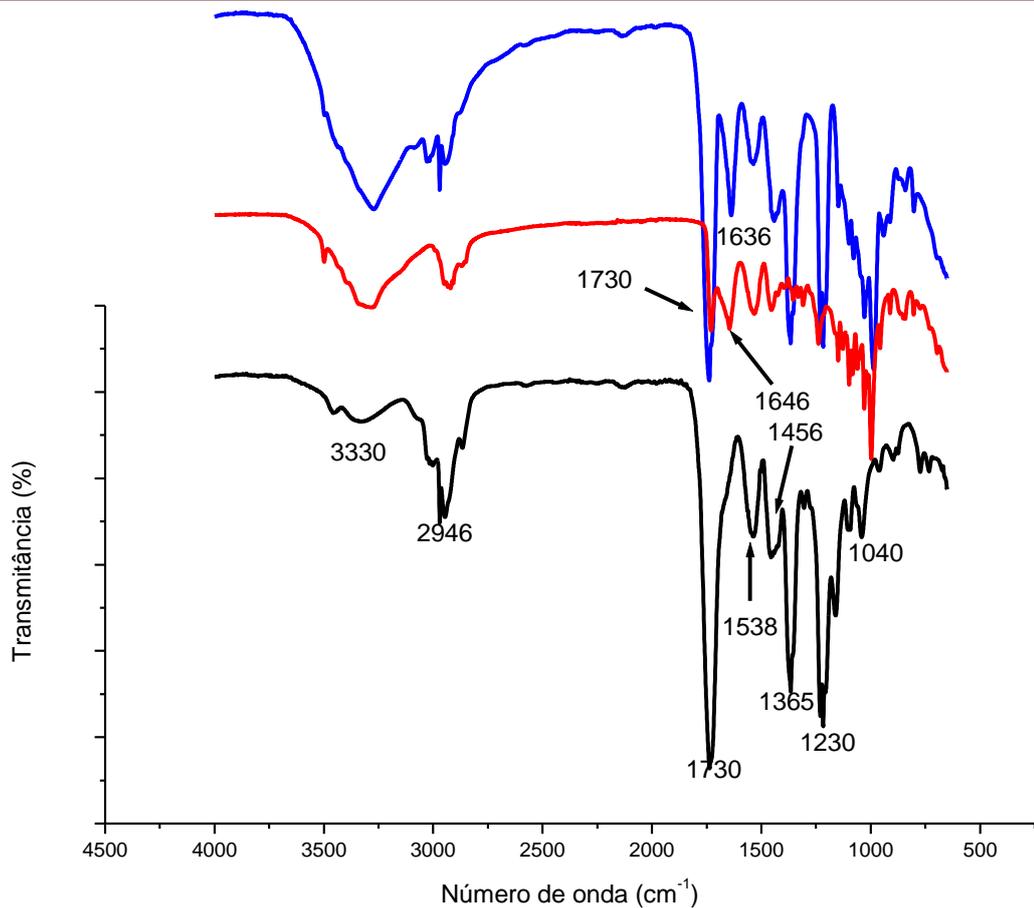


Figura 16 - Espectro de FTIR da Bevacizumabe-SCL (azul), do sistema (vermelho) e da PUD-LP (preto)

A banda da amida II ($1575 - 1480 \text{ cm}^{-1}$), evidenciada em 1538 cm^{-1} (**Figura 17**), indica a presença de deformação angular N-H e vibrações estiramento de C-N (CAKIC *et al.*, 2009). Ela mostra uma sensibilidade muito menor à conformação da proteína do que a amida I (KONG; YU, 2007). Na PUD-LP ela também é observada, indicando que essa banda não é específica do bevacizumabe nesse sistema.

A elevada sensibilidade para pequenas variações na geometria molecular e ligação de hidrogênio padrão, faz com que a banda da amida I ($1690 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) seja excepcionalmente útil e por isso muito utilizada para a análise da composição estrutural e das alterações na conformação da proteína secundária (KONG; YU, 2007). Essa banda pode indicar mudanças no espectro que correspondem a uma alteração no arranjo das folhas- β , característica dos anticorpos. Essa importância é devido à frequente agregação dos anticorpos que apresentam alterações na quantidade de folhas- β (WANG, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A banda existente em 1636 cm^{-1} , característica da amida I (KONG; YU, 2007) praticamente não absorve no sistema branco. Isso indica que nenhum componente do sistema, com exceção do bevacizumabe, apresenta uma banda expressiva em 1636 cm^{-1} , como fica claro na comparação da Bevacizumabe-SCL (**Figura 17**). Essa banda é assim característica do bevacizumabe.

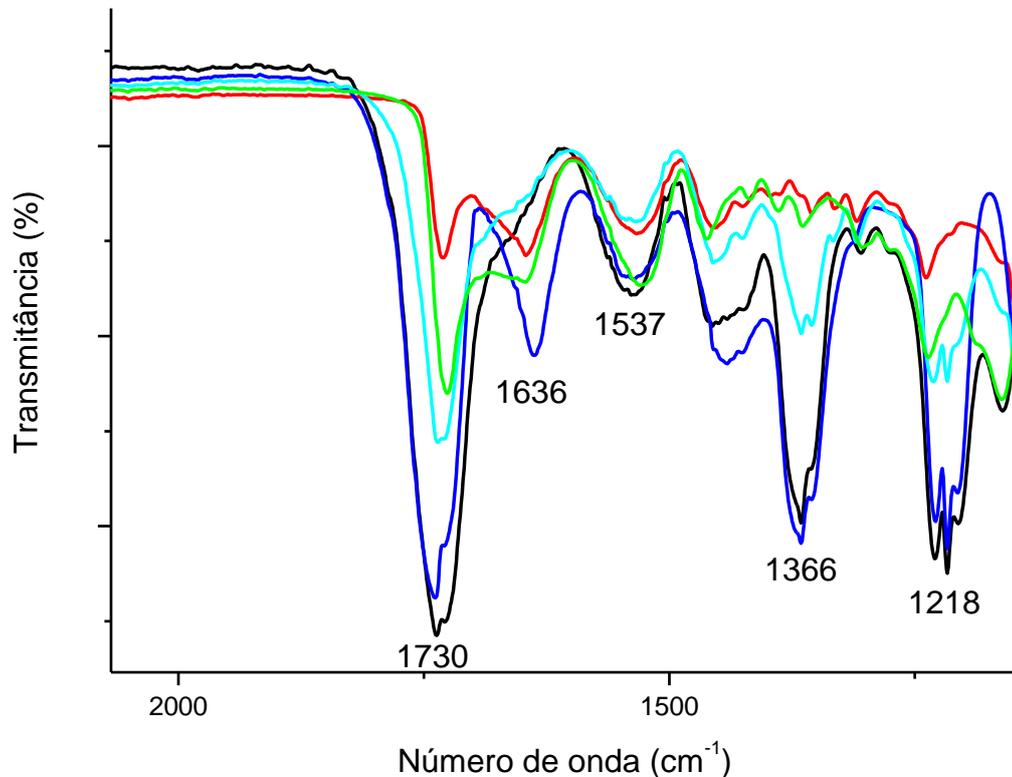


Figura 17 - Espectro de FTIR da PUD-LP (preto), sistema antes do estudo de liberação (vermelho), Bevacizumabe-SCL (azul escuro), sistema branco (azul claro) e sistema após o estudo de liberação (verde)

Na **Figura 17** a relação da banda em 1730 cm^{-1} , atribuída à carbonila do éster livre (CAKIC *et al.*, 2009), com a banda 1636 cm^{-1} do espectro da amida I foi utilizada para melhor compreender o sistema. A Bevacizumabe-SCL apresentou uma alta relação entre $1730/1636\text{ cm}^{-1}$, com a existência de pico em 1636 cm^{-1} , característico de amida I. Essa relação foi ainda maior para a PUD-LP, que apresentou uma grande absorção em 1730 cm^{-1} e praticamente não apresentou em 1636 cm^{-1} . Porém ao analisar o espectro do sistema, essa relação foi praticamente 1, pois as duas bandas apresentaram intensidade muito semelhante, indicando a ocorrência de algum tipo de interação, pois não preservou a proporção da relação observada na

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bevacizumabe-SCL e na PUD-LP. No sistema branco a relação entre as bandas foi menor que na PUD-LP, porém maior que no sistema, apresentando uma relação intermediária, sugerindo que caso exista uma interação, parte dela ocorreu com os excipientes da solução comercial de bevacizumabe, confirmando o que havia sido observado na análise de DSC. No entanto, após a incubação do sistema em PBS, com liberação do bevacizumabe, a relação voltou a elevar, ficando essa relação um pouco mais próxima à do sistema branco, embora menor que este, sugerindo que ainda existe bevacizumabe no sistema. A relação $1730/1636\text{ cm}^{-1}$ pode sugerir uma interação entre a PUD e a solução comercial de bevacizumabe, porém essa interação parece ser reversível, não interferindo na liberação do bevacizumabe do sistema.

A região da amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) apresenta uma alta sensibilidade a pequenas variações na geometria molecular, tornando essa região exclusivamente útil para análise da composição estrutural e trocas na conformação estrutural da proteína secundária. Além disso, essas bandas não se diferenciam devido à extensa sobreposição, pois elas se encontram muito próximas umas das outras, sendo instrumentalmente indistinguíveis. Assim, métodos matemáticos, como a deconvolução, são necessários para melhorar a compreensão dos espectros obtidos (KONG; YU, 2007).

6.2.4.1 Deconvolução

Na região da amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), cada tipo de estrutura secundária dá origem a diferentes alongamentos de C=O devido à geometria molecular única e aos padrões de ligação de hidrogênio (KONG; YU, 2007).

Foram realizados procedimentos de deconvolução dos espectros na região entre 1700 e 1600 cm^{-1} . A deconvolução foi realizada tendo como base seis picos que seriam responsáveis pela geração da banda observada.

Foi realizada a deconvolução dos espectros da Bevacizumabe-SCL, da PUD-LP, do sistema branco e do sistema antes e após o estudo de liberação. A PUD-LP e o

RESULTADOS E DISCUSSÃO

sistema branco praticamente não apresentaram absorção na região entre 1700 e 1600 cm^{-1} , confirmando que o pico nessa região é característico do bevacizumabe. A solução comercial de bevacizumabe e o sistema antes e após o estudo de liberação apresentaram pico nessa região. Embora exista a possibilidade da PUD-LP absorver nessa região, por ela ser típica da carbonila (C=O) que está presente na PUD-LP, não foi observada absorção significativa nessa banda, indicando uma mistura de fases.

A deconvolução apresentou a distribuição dos subpicos (**Figura 18**). As razões entre as intensidades das principais bandas foram avaliadas em relação à banda em $1636 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$, sendo assim utilizada como referência para as comparações. A Bevacizumabe-SCL apresentou uma distribuição das bandas entre 1620 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} e essas duas bandas extremas apresentaram maior intensidade em relação à banda em 1636 cm^{-1} apresentando 1,14 e 1,32 vezes respectivamente. A banda em 1629 apresentou intensidade próxima à da banda em 1636 cm^{-1} . A absorção em 1645 cm^{-1} apresentou uma pequena absorção em relação à banda 1636 cm^{-1} .

Existem relatos conflitantes na literatura entre a absorção exata relacionada a cada estrutura, mas em geral, as estruturas hélices- α apresentam um pico de absorção entre 1650 e 1658 cm^{-1} , as folhas- β tendem a ter bandas entre 1620 e 1640 cm^{-1} e entre 1670 e 1695 cm^{-1} , as estruturas *random* (aleatórias) ocorrem em torno de 1644 cm^{-1} (GLASSFORD; BYRNE; KAZARIAN, 2013). Esses valores correspondem à análise da proteína em meio aquoso e a análise nesse estudo foi realizada com a amostra liofilizada, por isso as absorções podem alterar um pouco. No entanto, não foram encontrados outros estudos, com esse nível de detalhamento, com bandas na região da amida I para amostras liofilizadas.

Na análise da Bevacizumabe-SCL foi encontrado que existe uma grande proporção das bandas correspondente às folhas- β , uma banda absorveu na região de hélices- α e a absorção correspondente à conformação *random* foi extremamente pequena em relação às demais.

Para um anticorpo IgG nativo o elemento predominante da estrutura secundária são as folhas- β e conformações *random*. Quantidades pequenas de hélices- α e de β -turn

RESULTADOS E DISCUSSÃO

podem estar presente (VERMEER; BREMER; NORDE, 1998). Portanto, a análise de deconvolução da Bevacizumabe-SCL sugere que conformação após a liofilização parece estar condizente com a de um anticorpo, não apresentando sinais de perda da estrutura no processo de liofilização.

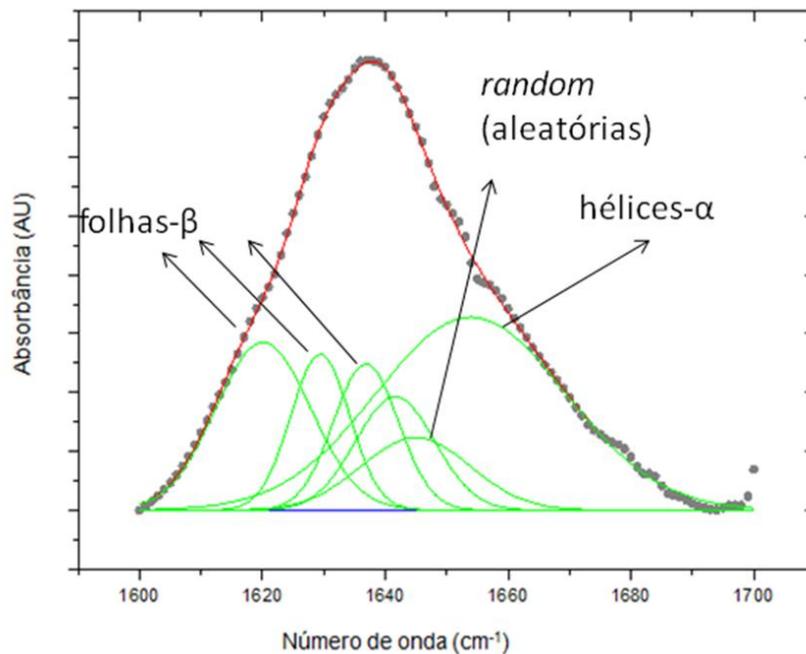


Figura 18 - Curva de deconvolução da banda da amida I de uma Bevacizumabe-SCL

No sistema as bandas estão distribuídas entre 1634 cm^{-1} e 1678 cm^{-1} (**Figura 19A**) e não foram observadas bandas menores que 1634 cm^{-1} , sendo esse pico o de maior intensidade, sugerindo a predominância de folhas- β . Porém foram detectados picos também na região de 1647 cm^{-1} que pode ser atribuído a conformações *random*, em 1660 cm^{-1} que pode ser devido à conformação em hélice e a 1678 cm^{-1} correspondente a β -turn (KONG; YU, 2007)

Embora possa ter ocorrido alguma alteração do bevacizumabe após incorporação no sistema, as conformações predominantes são as folhas- β e conformações *random*, que são elementos predominantes na estrutura secundária de anticorpos IgG, sugerindo que o sistema pode ter melhorado a estabilidade do bevacizumabe quando comparado a uma amostra do bevacizumabe liofilizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema após ter sido incubado em PBS pH 7,4 ainda apresentou a banda em 1636 cm^{-1} , que é característica de folhas- β , que pode ser atribuída ao anticorpo bevacizumabe (**Figura 19B**), sugerindo que este não foi completamente liberado do sistema mesmo após a incubação em PBS, porém o pico reduziu a intensidade em relação aos demais.

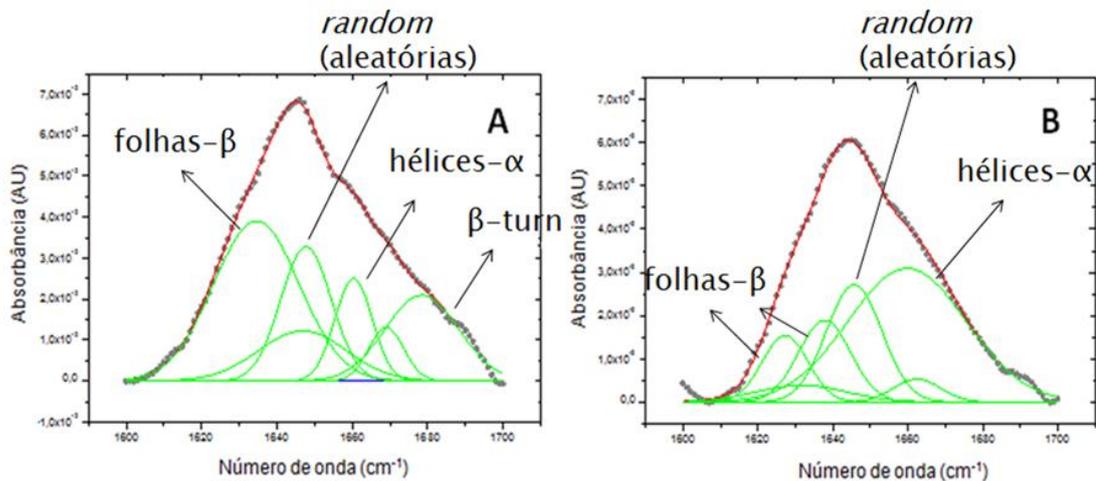


Figura 19 - Curvas de deconvolução da banda da amida I de amostras sistema antes do estudo de liberação (A) e após o estudo de liberação(B).

Devido à alta complexidade dos picos, não foi possível quantificar por FTIR o bevacizumabe que restou no dispositivo após o estudo de liberação e de acordo com Forato, Carlos Bernardes e Colnago (1997) métodos de aumento de resolução não apresentam confiabilidade para a quantificação da estrutura secundária das proteínas, devido à complexidade desses sinais e às interferências externas, devendo somente ser utilizado para análises qualitativas ou semi-quantitativas.

Contudo, na literatura são encontrados muitos relatos de quantificação de proteínas por meio de cálculos matemáticos, para permitir a visualização dos picos. Kong e Yu (2007) citam diversos autores que utilizaram cálculos matemáticos para realizar a quantificação de proteínas e os utiliza para calcular as porcentagens de diferentes conformações da região da amida I e também para avaliar a estabilidade dessas proteínas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3 Metodologia analítica para análise do bevacizumabe por CLAE

A varredura realizada do bevacizumabe determinou um comprimento de onda de 205 nm para trabalho (**Figura 20**). O cromatograma obtido apresentou pico simétrico, com tempo de retenção dentro do esperado e não foram observadas impurezas na análise da pureza do pico.

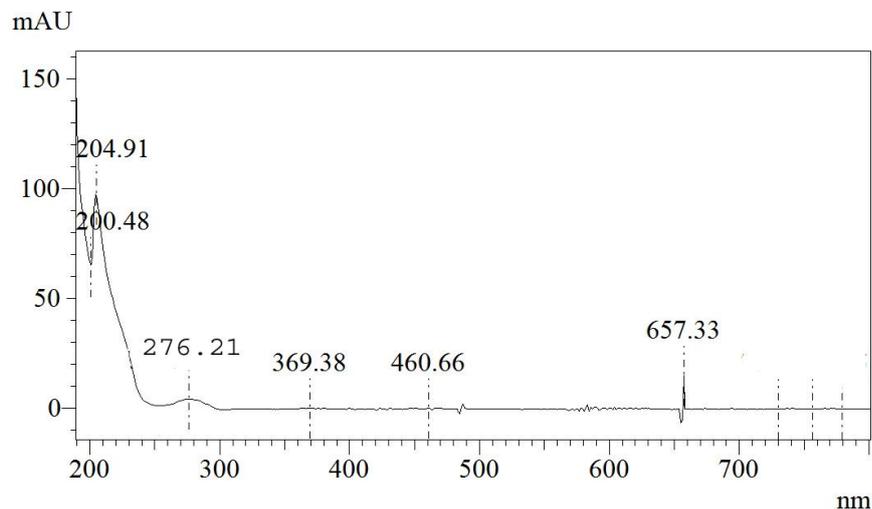


Figura 20 - Espectro de varredura do bevacizumabe pelo detector DAD do cromatógrafo, onde pode ser observado o λ máximo de absorção próximo a 205 nm.

As proteínas apresentam absorção na região de 280 nm e na região abaixo de 210 nm. A absorção na região de 280 nm ocorre devido aos aminoácidos que apresentam anel aromático (fenilalanina, triptofano e tirosina), porém algumas proteínas apresentam pouca quantidade desses aminoácidos e por isso apresentam uma absorbância pequena, não sendo adequada para quantificar pequenas concentrações, devido ao limite de quantificação (BURGES R. RICHARD; DEUTSCHER, 2009).

Na literatura são encontrados relatos de diversos métodos que utilizam técnicas de CLAE utilizando comprimento de onda de 280 nm para quantificar anticorpos monoclonais, entre eles o bevacizumabe (PAUL *et al.*, 2012). Existem também estudos por CLAE, que após a comparação de diversos comprimentos de onda, definiram pela escolha do comprimento de onda de 214 nm para a quantificação (GROTEFEND *et al.*, 2012; NAVAS *et al.*, 2013). Contudo o grande número de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ligações peptídicas existente nas proteínas pode fazer com que análises a 205 nm sejam mais sensíveis e mostrem menor variabilidade que a 280 nm (BURGES R. RICHARD; DEUTSCHER, 2009).

Gomes *et al.* (2012) utilizaram o comprimento de onda de 279 nm, porém o pico referente ao bevacizumabe era pequeno, prejudicando a detecção da formação de agregados e produtos de degradação.

O pico do bevacizumabe, também chamado de pico do monômero eluiu em aproximadamente 7,9 minutos. O pequeno pico com eluição em 6,5 minutos pode ser atribuído à formação de espécies de elevada massa molecular, provenientes da formação de agregados, como oligômeros de bevacizumabe.

Usualmente o teor do monômero é tratado como recuperação relativa do monômero e a relação em porcentagem existente em cada análise entre o seu pico e o dos agregados e/ou produtos de degradação, é apresentada para a avaliação do anticorpo.

O coeficiente de correlação encontrado para a média das 03 curvas preparadas a partir de 03 soluções estoque diferentes e analisadas em dias diferentes foi de 0,999. O método confirmou ser linear, para o intervalo de concentrações entre 5 a 75 µg/mL, conforme equação da reta $y = 33614x - 10813$. Esta equação foi obtida calculando-se a média dos valores de inclinação e intercepto com o eixo Y encontrado nas 3 curvas de calibração construídas. Por meio de análise de variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$).

Os componentes do branco da solução comercial de bevacizumabe, da fase móvel e da solução tampão PBS pH 7,4 que foi utilizada como solução diluente não interferiram no método analítico, pois não apresentaram nenhuma absorção no mesmo tempo de retenção que o bevacizumabe ou de seus picos provenientes de degradação e agregação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas obtidos do meio proveniente da incubação do sistema branco apresentaram alteração na linha de base com 12,5 minutos, exibindo um bom tempo de separação, o que resultou em uma boa resolução entre o bevacizumabe e os excipientes do sistema, não havendo sobreposição ou interferência no pico referente ao bevacizumabe, comprovando a seletividade e especificidade do método.

O placebo fortificado apresentou pico com mesmo tempo de retenção, simetria e largura que o pico obtido para o bevacizumabe, indicando que os excipientes do sistema não interferiram na seletividade do método.

O método cromatográfico com detecção por DAD se mostrou específico, pois não houve sobreposição de picos, nem coeluição de interferentes com o composto de interesse, no caso o bevacizumabe.

6.4 Avaliação da estabilidade do bevacizumabe por meio de CLAE

A estabilidade do bevacizumabe foi avaliada em alguns estudos e os resultados indicaram que esse anticorpo é relativamente estável, contudo ainda existe pouca informação disponível sobre a estabilidade quando em condições de estresse induzidas durante estudos com o fármaco no preparo de novos tipos de formulação, motivando a realização desse trabalho.

No estudo com o bevacizumabe armazenado em diferentes condições de temperatura, o fármaco não apresentou alteração significativa no teor avaliado por CLAE a -20°C e nem nas condições de transporte (**Tabela 5**). As amostras a -80°C apresentaram redução do pico do monômero, porém de maneira heterogênea entre os lotes, sendo evidenciado pelo grande desvio. Em nenhuma das amostras congeladas houve formação de picos adicionais indicativos de degradação ou formação de agregados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5 - Porcentagem de monômeros e agregados em diferentes temperaturas de armazenamento

Temperatura/ Estresse	Recuperação relativa do monômero (%)	Monômeros (%)	Agregados (%)
-80°C	73,89 ± 19,68	98,26 ± 0,10	1,74 ± 0,10
-20°C	103,3 ± 1,79	98,35 ± 0,22	1,65 ± 0,22
Transporte	99,19 ± 1,86	98,38 ± 0,11	1,62 ± 0,11

As amostras em solução PBS pH 7,4 apresentaram pequena redução do monômero a 4°C e a temperatura ambiente no período de 2 semanas, porém a 37°C/30RPM o monômero apresentou redução média de 17,7% com a formação de picos após o pico do monômero em relação ao controle (**Tabela 6**), indicativos de degradação do bevacizumabe, mas sem a formação de agregados detectados por esse método de análise.

Tabela 6 - Porcentagem de monômeros e agregados da Bevacizumabe-SCL em PBS pH 7,4 submetidos diferentes condições de estresse

Temperatura/ Estresse	pH	Recuperação relativa do monômero (%)	Monômeros (%)	Agregados (%)
4°C	7,4	97,01 ± 1,21	98,35 ± 0,11	1,65 ± 0,11
Temperatura ambiente	7,4	97,81 ± 2,23	98,50 ± 0,14	1,50 ± 0,14
37°C/30RPM	7,4	82,29 ± 6,52***	98,78 ± 0,33*	1,22 ± 0,33*

Valores foram considerados significativamente diferentes do controle preparado no mesmo dia da análise (*p < 0,05, ***p < 0,001, Bonferroni)

O bevacizumabe foi degradado em metanol e acetonitrila, sendo visualizado um precipitado de coloração branca com quase completa eliminação do pico do

RESULTADOS E DISCUSSÃO

monômero e surgimento de outros picos no cromatograma. As amostras em trizol não apresentaram o pico do monômero.

A Bevacizumabe-SCL após reconstituição no diluente PBS 7,4 apresentou o mesmo perfil que a solução comercial de bevacizumabe, sem apresentar queda de teor (Figura 21).

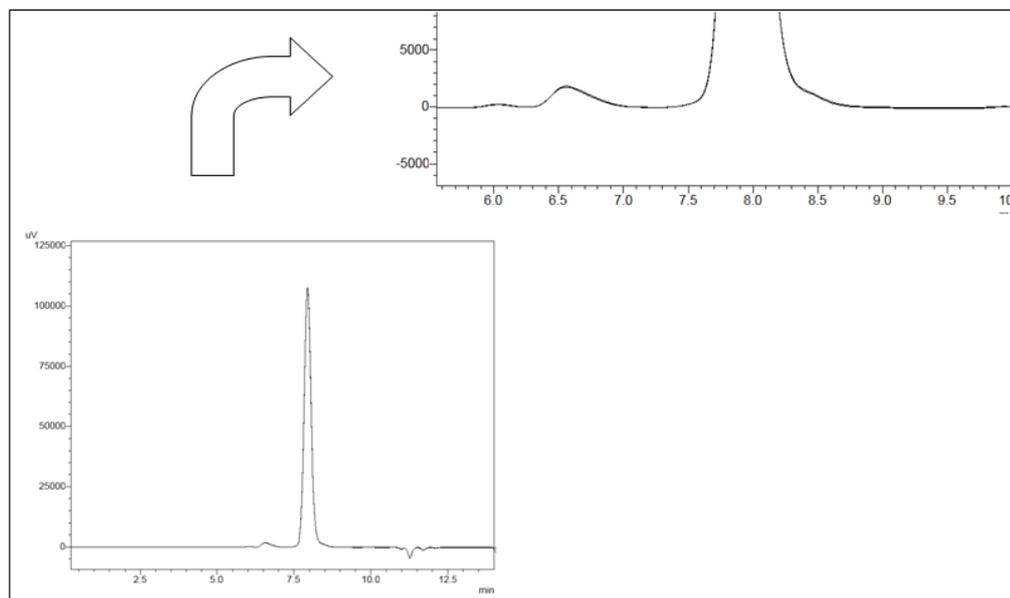


Figura 21 - Sobreposição dos picos da Bevacizumabe-SCL e da solução comercial de bevacizumabe

Essas análises foram importantes para conhecer melhor o anticorpo bevacizumabe. Foi demonstrado que o bevacizumabe degrada em 2 semanas ou menos quando colocado a 37°C e sob agitação. Para minimizar esse problema, foi adotada a utilização de um controle para todas as amostras submetidas aos estudos que envolvem essa condição, independente do período de exposição.

6.5 Estudo de liberação *in vitro* dos sistemas contendo bevacizumabe

Os sistemas foram incubados em solução tampão PBS pH 7,4 e a recuperação relativa do monômero em porcentagem de bevacizumabe que foi liberada a partir do sistema no primeiro dia foi $45,26 \pm 1,45\%$, sendo a porcentagem relativa de monômeros e espécies com elevada massa molecular de $98,38 \pm 0,14\%$ e $1,62 \pm$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

0,14%, respectivamente. Esses valores não são diferentes estatisticamente da porcentagem relativa de monômeros e espécies com elevada massa molecular do bevacizumabe que foi de $98,26 \pm 0,12 \%$ e $1,74 \pm 0,12 \%$, respectivamente, utilizando Bonferroni.

Ao lado do pico do monômero pode ser observado um pequeno pico com tempo de retenção maior que esse (**Figura 22**), ou seja, que apresenta uma massa molecular menor, isso é indicativo de degradação do anticorpo (ISHIKAWA *et al.*, 2010) e pode ser resultado de clivagem enzimática ou não enzimática (FEKETE *et al.*, 2013). Baseado nessa informação, a integração do pico observado na CLAE foi de maneira a desconsiderar o pico com tempo de retenção maior que o do bevacizumabe.

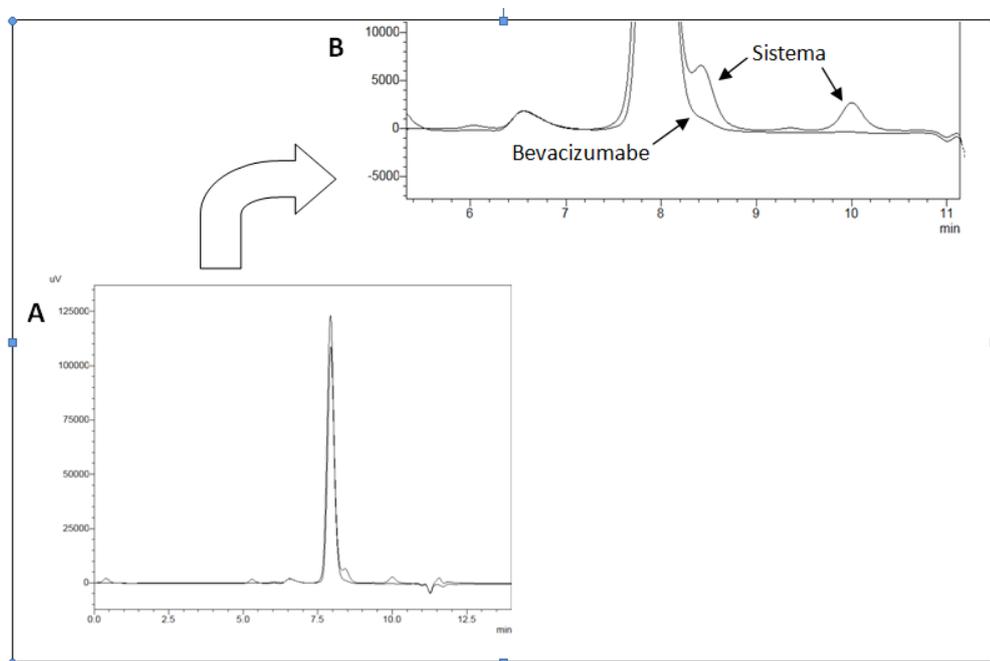


Figura 22 - Sobreposição em escala normal (A) e ampliada (B) dos cromatogramas do bevacizumabe e do sistema, indicando a formação de moléculas de baixo massa molecular.

Não foi observada por essa técnica a formação de agregados nos sistemas de bevacizumabe, referente a espécies com elevada massa molecular devido à agregação de dois ou mais anticorpos. Ishikawa *et al.* (2010) observaram a formação desses agregados em soluções do anticorpo em pHs ajustados para 7,0 e não observaram essa formação em pHs ajustados para 5,5, sugerindo que a estabilidade dos anticorpos seria maior em pHs mais baixos. Porém, embora o pH

RESULTADOS E DISCUSSÃO

do sistema seja alto devido ao acréscimo de hidrazina, não foi observada a formação de agregados por esse método. A CLAE é um método indicado para detectar agregados solúveis, uma vez que as amostras são filtradas em filtro 0,22 µm (WANG, 2005), não sendo por isso possível detectar agregados insolúveis por esse método. Foi realizada uma eletroforese para avaliar o perfil proteico do bevacizumabe após o estudo de liberação para detectar a possível formação de agregados insolúveis.

A PUD é proveniente de macromoléculas insolúveis que são convertidas em pequenas moléculas solúveis, por meio da clivagem hidrolítica de ligações lábeis da sua cadeia. Nesse caso o fármaco fica disperso no polímero que é um sistema monolítico biodegradável. A liberação desse fármaco pode ocorrer por difusão, degradação do polímero ou por combinação destes dois mecanismos (KIMURA; OGURA, 2001). A grande porcentagem liberada dos sistemas no primeiro dia sugere que a liberação do bevacizumabe ocorreu por um processo de difusão através de poros e canais recém-formados ou pré-existentes e não por um processo de degradação do polímero. Esse fato está condizente com os resultados da MEV, que após dois dias de incubação em tampão PBS apresentou grandes poros na superfície, sugerindo uma grande liberação. Tendência semelhante foi relatada em outros sistemas de liberação a base de poliuretano contendo uma proteína óssea morfogenética humana recombinante tipo-2, como os estudados por Kim e Hollinger (2012) que liberou mais de 95% nos primeiros seis dias, mesmo com a proteína incorporada na etapa de síntese do poliuretano para aumentar o tempo de liberação.

Apesar de ter ocorrido uma grande liberação de bevacizumabe no primeiro dia, não foi detectado mais nenhuma liberação nos sete dias seguintes nas amostras coletadas. A análise de FTIR demonstrou que existe bevacizumabe no sistema mesmo após o estudo de liberação, no entanto pode ter ocorrido um impedimento da saída do restante do bevacizumabe devido a um mecanismo ainda não identificado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.6 Estudo de degradação *in vitro* dos sistemas

Foi realizado um estudo para avaliar a perda de peso do sistema por um período de 100 dias. Alterações no peso podem ser decorrentes da degradação do polímero ou liberação do bevacizumabe e dos excipientes da solução comercial de bevacizumabe. O sistema apresentou uma grande perda inicial, liberando o equivalente a $48,03 \pm 0,80\%$ em dois dias de incubação em PBS a $30^\circ\text{C}/\text{RPM}$ (Figura 23).

O sistema liberou $45,26 \pm 1,45\%$ do bevacizumabe em 24 horas segundo quantificação por CLAE, entretanto, segundo a análise de FTIR ainda existe uma quantidade de bevacizumabe considerável no sistema. Assim, sabendo que a quantidade de bevacizumabe correspondente ao total de sólidos da solução comercial de bevacizumabe é $27,05\%$, essa perda de peso sugere que juntamente com os $45,26\%$ de bevacizumabe, também foram liberados todos os excipientes da solução comercial de bevacizumabe nesse período.

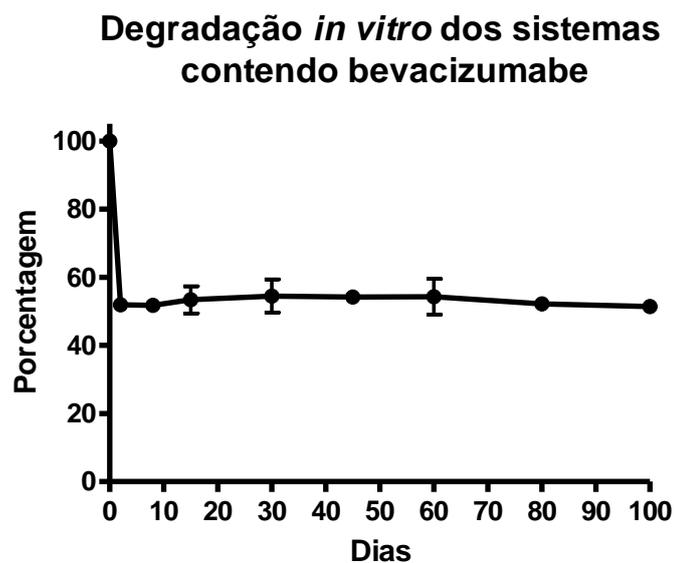


Figura 23 - Perda de peso relacionada à degradação *in vitro* dos sistemas contendo bevacizumabe

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.7 Avaliação *in vitro* da viabilidade celular pela redução do MTT

As amostras colocadas sob agitação para liberação em tampão PBS 7,4 foram pesadas antes e após a incubação. As quantidades liberadas baseado no peso dos sistemas estão relacionadas abaixo:

- Sistema – 50,47%;
- Sistema branco – 49,56%;
- PUD-LP – 10,86%;
- PUD + hidrazina – 6,81%.

A **Figura 24** mostra a porcentagem de células viáveis em relação ao controle, fixado em 100%. A viabilidade das células Mio-M1 submetidas ao meio proveniente da incubação foi maior para o sistema ($93,24 \pm 6,73\%$) que para a amostra com a mesma concentração da solução comercial de bevacizumabe ($91,17 \pm 7,24\%$), sugerindo que o bevacizumabe foi o responsável pela redução da viabilidade celular observada e não os demais componentes do sistema.

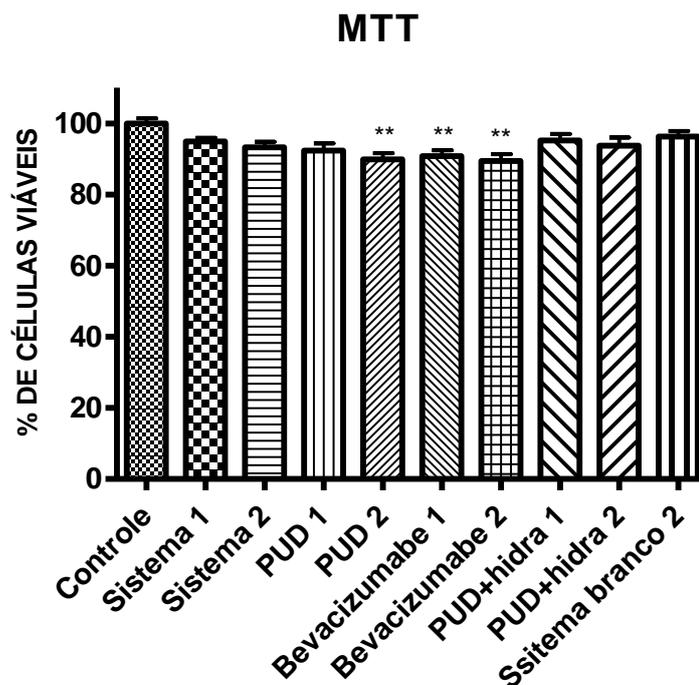


Figura 24 - Viabilidade das células Mio-M1 incubadas no meio de cultura contendo produtos de degradação do sistema com menor concentração (Sistema 1), sistema com maior concentração (Sistema 2), PUD-LP com menor concentração (PUD 1), com maior concentração

RESULTADOS E DISCUSSÃO

(PUD 2), solução comercial de bevacizumabe com menor concentração (Bevacizumabe 1), solução comercial de bevacizumabe com maior concentração (Bevacizumabe 2), PUD + hidrazina com menor concentração (PUD + hidra 1), PUD + hidrazina com maior concentração (PUD + hidra 2) e sistema branco equivalente a maior concentração do sistema (Sistema branco 2). (**p < 0,01 – ANOVA e Bonferroni)

De acordo com a análise estatística por ANOVA e pós-teste de múltipla comparação Bonferroni, somente as amostras de PUD-LP com maior concentração ($89,91 \pm 7,73\%$) e ambas as concentrações da solução comercial de bevacizumabe ($90,83 \pm 7,04\%$ e $89,45 \pm 8,29\%$) apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Porém essa redução da viabilidade não é característica de toxicidade, pois a redução é considerada insignificante para se considerar uma formulação citotóxica. Nenhuma das demais amostras apresentou diferença significativa entre o grupo controle ou entre elas.

Esses resultados estão condizentes com os apresentados por Silva *et al.* (2010), que em um estudo semelhante, avaliaram a citotoxicidade da PUD-LP e observaram que eles não apresentaram toxicidade para as células epiteliais pigmentares da retina (ARPE-19), pois não houve resultado estatisticamente diferente para as células que foram submetidas ao meio que foi incubado com a PUD-LP, apresentando assim grande potencial para utilização como sistema de liberação de fármacos.

6.8 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) – SDS (SDS-PAGE)

As bandas do bevacizumabe e do controle positivo (solução comercial de bevacizumabe diluída em PBS e incubada por 24 horas a $37^{\circ}\text{C}/30\text{RPM}$) apresentaram o perfil semelhante (**Figura 25**), demonstrando que submeter a solução comercial de bevacizumabe a $37^{\circ}\text{C}/30\text{RPM}$ por 24 horas não provocou formação de agregados e nem aumento da clivagem do anticorpo. O perfil obtido apresentou bandas de alta intensidade em 150 KDa, que correspondem a massa molecular do bevacizumabe íntegro. Podem ser também observadas bandas de menor massa molecular que essa em ambas as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

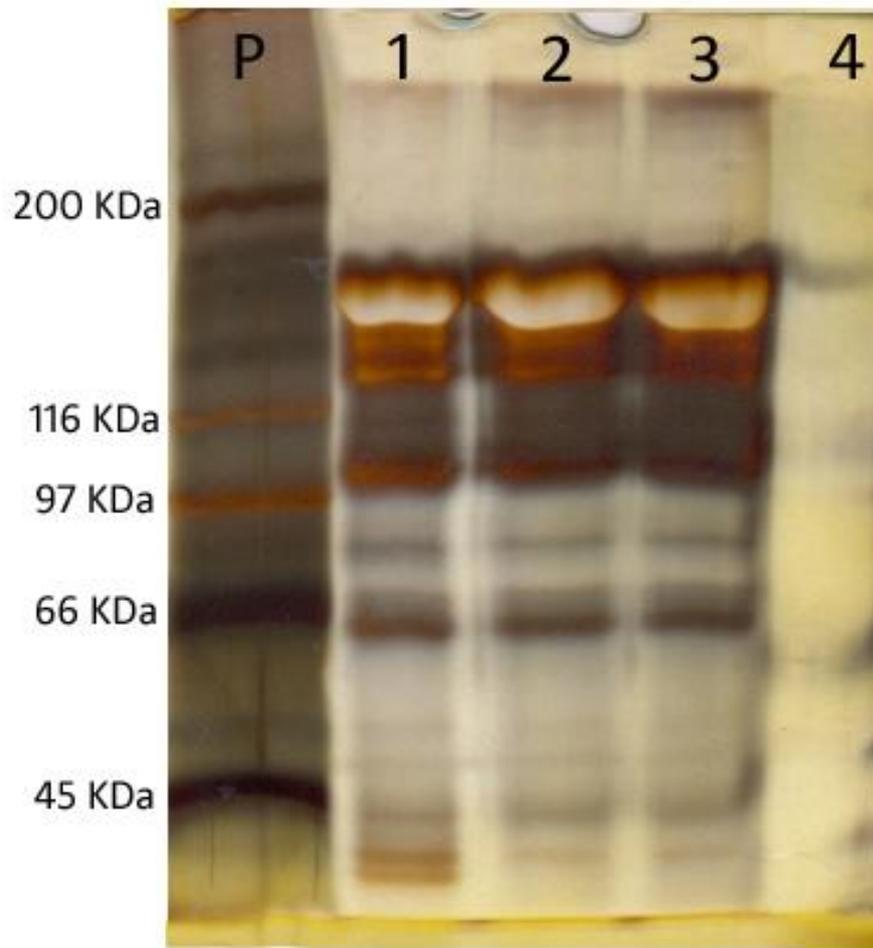


Figura 25 - SDS-PAGE 7,5% (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) corado com nitrato de prata. Padrão de massa molecular Sigma (número do catálogo SDS6H2) (P), amostras do sistema (1), da solução comercial de bevacizumabe (2), do controle positivo (solução comercial de bevacizumabe submetida à mesma condição do sistema) (3) e do sistema branco (4). O sistema, o controle positivo e o sistema branco foram incubadas em PBS pH 7,4 a 37°C e 30 RPM por 24 horas.

O perfil eletroforético do bevacizumabe obtido após o estudo de liberação do sistema *in vitro* apresentou perfil semelhante ao bevacizumabe, porém a banda com massa molecular menor que 45 KDa apresentou maior intensidade no sistema que no bevacizumabe, sugerindo a ocorrência de uma pequena clivagem do bevacizumabe no preparo do sistema, conforme foi detectado por CLAE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

SDS-PAGE fornece uma excelente resolução dos fragmentos e esse método é amplamente utilizado para monitorar a fragmentação em mAbs. A coloração por prata torna essa técnica ainda mais sensível e para controlar a qualidade dos medicamentos contendo mAb, é importante avaliar os fragmentos existentes. Para a clivagem ocorrida em certos locais, como a fragmentação na região da dobradiça, a utilização de CLAE empregando SEC pode ser a mais adequada. A fragmentação das ligações peptídicas na região da dobradiça dos anticorpos é bem documentada na literatura e é susceptível à hidrólise, gerando fragmentos correspondentes à região Fab, Fc e um anticorpo faltando um dos segmentos Fab. Por outro lado, os anticorpos podem ser fragmentados em outras regiões que não a da dobradiça e nesse caso a eletroforese utilizando SDS-PAGE, parece ser um método adequado para capturar o perfil global de fragmentação do anticorpo (LIU; GAZA-BULSECO; LUNDELL, 2008; VLASAK; IONESCU, 2011).

A fragmentação é uma das principais vias de degradação dos anticorpos, apesar da alta estabilidade das ligações peptídicas. A fragmentação é um termo que geralmente refere-se à ruptura de uma ligação covalente de uma proteína, como resposta a uma reação espontânea ou enzimática. A estrutura da proteína é extremamente estável sob condições fisiológicas, mas pode tornar-se propensa a fragmentação em função de fatores como a sequência de aminoácidos, pois a presença de cadeias laterais específicas podem facilitar a clivagem, a flexibilidade da cadeia do anticorpo, a exposição a solventes, extremos de pH, elevadas temperaturas e na presença de metais ou de radicais (LIU; GAZA-BULSECO; LUNDELL, 2008; VLASAK; IONESCU, 2011).

O SDS-PAGE é uma técnica capaz de detectar agregados solúveis e insolúveis, mas nenhum dos dois tipos de agregados foi detectado no bevacizumabe liberado do sistema. A análise de CLAE é capaz de detectar a formação de agregados solúveis, contudo nenhum agregado foi observado por essa técnica. Essas observações sugerem que não existem agregados no sistema nem mesmo após 24 horas de incubação em tampão pH 7,4, 37°C/30RPM. Proteínas geralmente tendem a agregar sob uma variedade de condições ambientais em comparação com pequenas moléculas de fármacos. Esses agregados de proteína podem exibir características menos desejáveis como reduzida ou nenhuma atividade biológica, o

RESULTADOS E DISCUSSÃO

potencial para a imunogenicidade e outros efeitos colaterais (WANG; NEMA; TEAGARDEN, 2010).

6.9 Avaliação da angiogênese utilizando o modelo CAM

A análise da atividade antiangiogênica dos sistemas desenvolvidos foi realizada por meio do ensaio da membrana corioalantóica do embrião de galinha. A solução de bevacizumabe foi utilizada como controle positivo por ser um fármaco com reconhecido poder antiangiogênico.

As porcentagens de vasos sanguíneos na CAM após tratamento com PBS (controle negativo), com o meio proveniente da liberação do sistema e com a solução comercial de bevacizumabe (controle positivo) estão apresentadas na **Figura 26**.

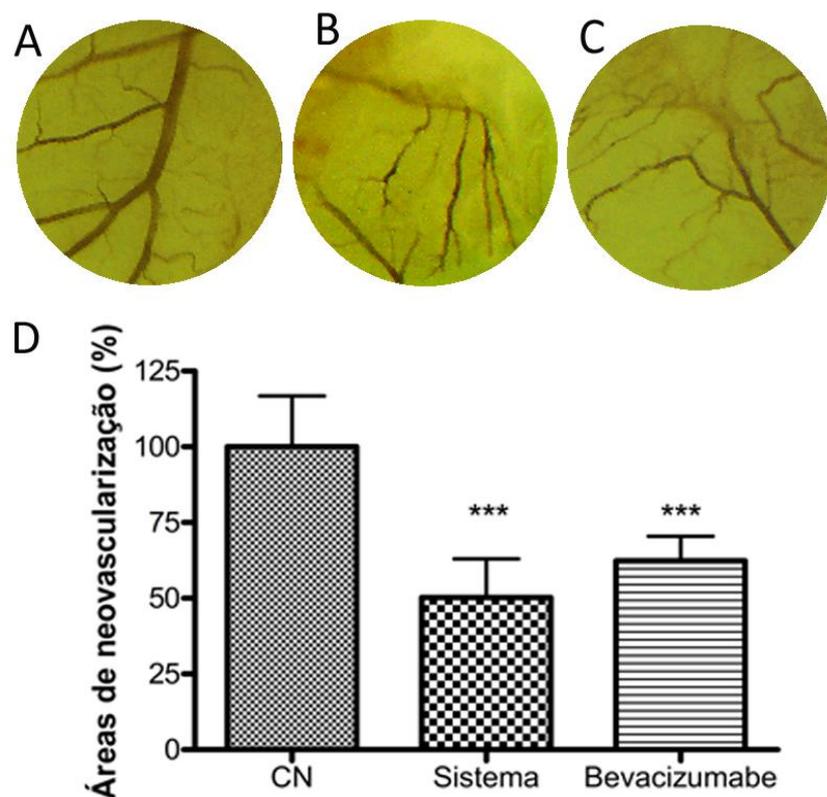


Figura 26 - Efeito do sistema na inibição da angiogênese no ensaio da CAM. Controle negativo - CAM (CN) (A), sistema - CAM (B), solução comercial de bevacizumabe - CAM (C) e porcentagem de vasos sanguíneos na CAM após os tratamentos (D). Os valores são expressos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

de acordo com o grupo CN, o qual foi fixado em 100%. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão relativo (n = 14). Os valores são significativamente diferentes do grupo CN para sistema PUD bevacizumabe carregado e solução comercial de bevacizumabe (teste de comparação múltipla de *** p < 0,001, ANOVA-Bonferroni).

Os resultados mostraram que o sistema reduziu significativamente os vasos sanguíneos da CAM. A porcentagem média de vasos sanguíneos restantes na CAM após a aplicação do sistema (50,27 \pm 12,7%) foi significativamente mais baixa do que o controle negativo, definido como 100% (p < 0,001). Não houve diferença significativa entre a porcentagem de vasos sanguíneos na CAM analisada com o sistema e com a solução comercial de bevacizumabe (62,37 \pm 8,07%) para p < 0,001.

O controle positivo foi preparado com uma concentração igual à quantidade total de bevacizumabe existente no sistema. Porém as análises de CLAE revelaram que ocorre a liberação de apenas 45,26% do bevacizumabe do sistema nesse período. Portanto, o bevacizumabe do sistema reduziu os vasos sanguíneos da CAM com aproximadamente a metade da concentração de bevacizumabe que o controle positivo e sem apresentar diferença significativa.

Considerando que o aspecto da CAM não foi alterado após a aplicação do meio proveniente da liberação dos sistemas, não tendo sido observada neovascularização nem resposta inflamatória aguda, é possível sugerir que não houve sinais de toxicidade local das amostras avaliadas sobre a vasculatura normal da membrana **(Figuras 26A, 26B e 26C)**.

Devido à ausência de diferença estatística quanto à porcentagem de vasos sanguíneos na CAM entre o sistema e a solução comercial de bevacizumabe, pode ser sugerido que o bevacizumabe manteve a sua atividade antiangiogênica quando incorporado ao sistema.

O bevacizumabe se liga ao VEGF-A bloqueando a ligação aos seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2. Dessa maneira ele previne a estimulação de migração celular

RESULTADOS E DISCUSSÃO

do endotélio vascular, a proliferação, a sobrevivência e a permeabilidade vascular (CHENG *et al.*, 2012).

Nowak-Sliwinska *et al.* (2012) aplicaram diferentes doses de bevacizumabe e observaram que a redução da angiogênese é proporcional à dose de bevacizumabe aplicada na CAM.

Os resultados sugerem que o sistema possui potencial para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização, devido à biocompatibilidade e atividade antiangiogênica promissora *in vivo* avaliada no modelo da CAM.

6.10 Avaliação da atividade *in vivo* do sistema em modelo animal

6.10.1 Avaliação clínica

A aplicação tópica é o método preferido de administração de um fármaco para tratamento ocular. A utilização de um sistema de liberação que evite a necessidade da aplicação repetida do medicamento na córnea melhora ainda mais a adesão do paciente ao tratamento. No entanto, para que o tratamento tópico seja eficaz é necessário que o fármaco penetre através da barreira epitelial para atingir os tecidos alvos (DASTJERDI *et al.*, 2009). A administração tópica de imunoglobulinas inteiras, tais como bevacizumabe, com uma massa molecular de 149kD, é geralmente considerada ineficaz porque estas moléculas são muito grandes para penetrar o epitélio da córnea intacta (MOISSEIEV *et al.*, 2014). No entanto, o epitélio da área com neovascularização não é perfeito, permitindo a passagem e ação terapêutica do bevacizumabe (DASTJERDI *et al.*, 2011).

O exame clínico de todas as córneas imediatamente após a indução de neovascularização mostrou uma lesão reprodutível no centro da córnea, com aparência opaca e rápida formação de novos vasos (**Figura 27**).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

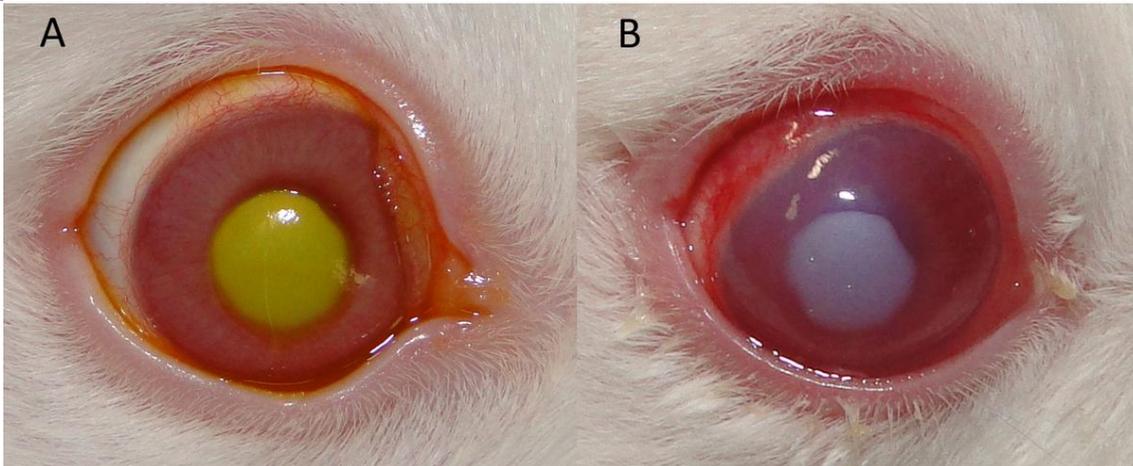


Figura 27 - Fotografias dos olhos dos coelhos demonstrando o local onde ocorreu a lesão alcalina no dia da indução da neovascularização, corado em amarelo, utilizando colírio específico para diagnosticar úlceras na córnea (A) e 24 horas após a indução da neovascularização (B).

As análises de termografia infravermelha mostraram que a temperatura média da superfície da córnea foi aumentada de $35,86 \pm 0,39$ °C para $37,17 \pm 0,46$ °C após a indução da neovascularização da córnea. Esse resultado foi significativamente diferente (*** $p < 0,001$, teste t, $n = 8$), indicando a formação de novos vasos nos olhos dos coelhos, 24 horas após a indução do processo angiogênico.

A avaliação clínica da superfície ocular mostrou redução dos sinais clínicos nos grupos tratados com o sistema e com a solução comercial de bevacizumabe em relação ao grupo controle negativo (PBS) para o edema da córnea, edema de íris e hiperemia conjuntival (**Figura 28**). Embora os desvios em um mesmo grupo sejam consideráveis, a avaliação da neovascularização da córnea ainda apresentou diferença significativa para o sistema em relação ao controle negativo nos dias 2 e 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

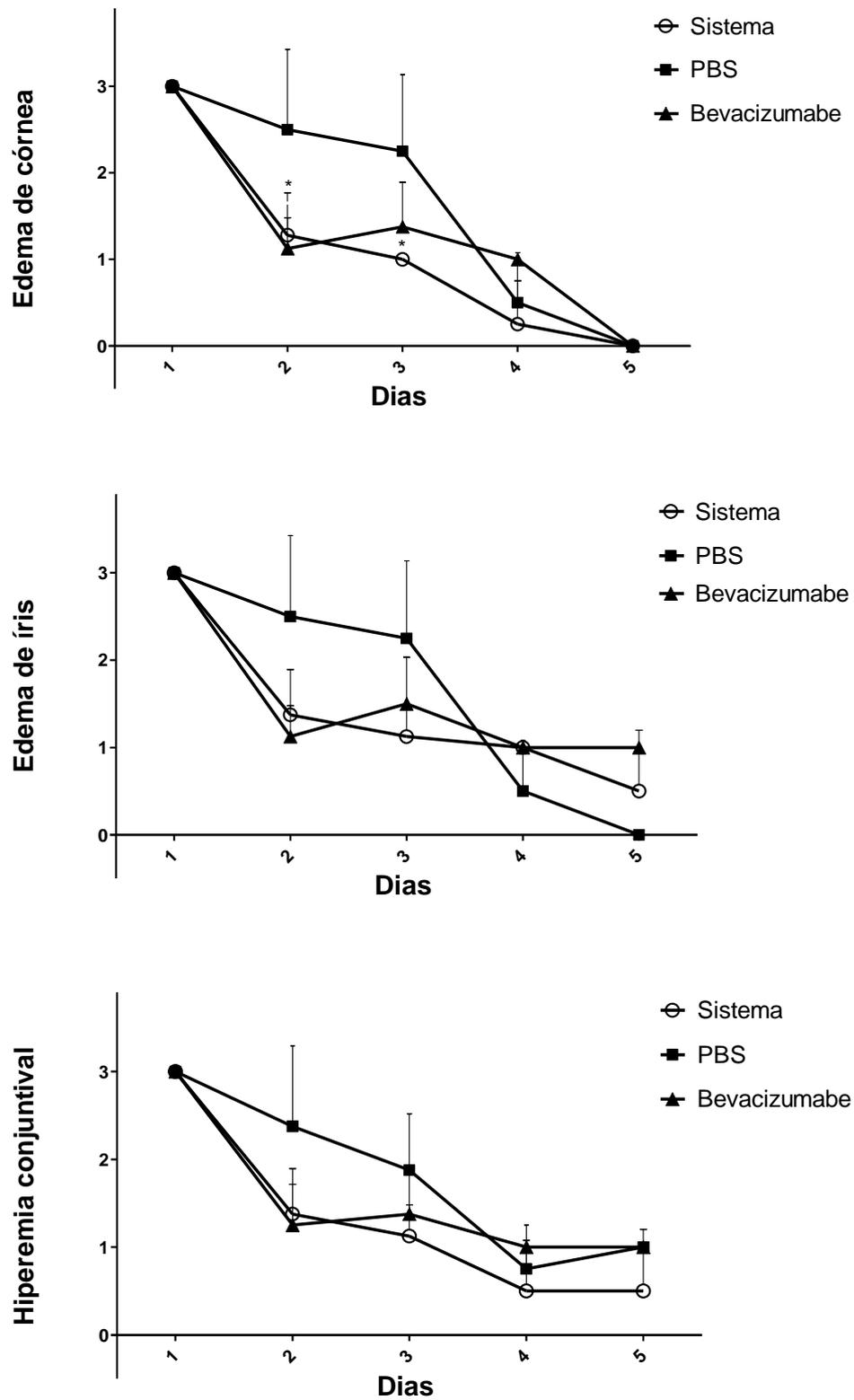


Figura 28 - Média dos escores dos sinais clínicos após o tratamento da neovascularização corneal induzida. Escores: 0 não apresenta problema, 1 discreto, 2 moderado e 3 intenso.

(*p < 0,05, ANOVA-Dunn's)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação clínica da superfície ocular mostrou que a neovascularização pode ser inibida pelos sistemas e a sua atividade foi similar à da solução comercial de bevacizumabe. É importante ressaltar que a quantidade total de bevacizumabe no sistema foi 17 vezes menor que a quantidade total aplicada durante um dia da solução comercial de bevacizumabe. A quantidade da solução comercial de bevacizumabe foi aplicada em quantidade maior devido ao estudo realizado por Yoeruek *et al.* (2008), que verificaram que nessa dose o bevacizumabe foi capaz de inibir a neovascularização da córnea no mesmo modelo animal utilizado nesse trabalho.

Hobot-Wilner *et al.* (2010) induziram a neovascularização corneana em ratos utilizando nitrato de prata. Os animais foram tratados com a solução comercial de bevacizumabe aplicada topicamente em diferentes concentrações: 1, 2 e 4 mg/ml, 2 vezes ao dia por um período de 7 dias. Na avaliação clínica somente os grupos que receberam a aplicação de 2 e 4 mg/ml da solução comercial de bevacizumabe apresentaram redução significativa da neovascularização. No exame histopatológico apenas o grupo tratado com 4 mg/ml diferiu significativamente do grupo controle. Sugerindo que a eficácia do bevacizumabe está relacionada com a concentração utilizada no tratamento.

Kim, Jeong e Chung (2010) induziram a neovascularização corneana com um fio de sutura no estroma da córnea de coelhos. Uma semana após o processo de indução, os coelhos foram divididos em grupos e tratados com 5 e 10 mg/mL de bevacizumabe tópico duas vezes ao dia por duas semanas e com 1,25 mg/mL de bevacizumabe injetado por via subconjuntival. Eles realizaram diferentes métodos de análise para avaliar a neovascularização. Em todos os métodos a área de neovascularização dos grupos tratados foi significativamente menor que a do grupo controle. Um dos métodos revelou uma maior redução da neovascularização do grupo tratado por via tópica com a maior concentração de bevacizumabe que as demais formas de tratamento. Sugerindo que a redução da neovascularização está relacionada à dose aplicada e que o tratamento por via tópica é interessante na redução da neovascularização corneana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inibição da neovascularização pelo sistema sugere que o bevacizumabe liberado estava em sua forma ativa e que foi capaz de alcançar a dose terapêutica em quantidade muito menor que as utilizadas em outros estudos. A redução da concentração de bevacizumabe pode reduzir o risco de eventos adversos e o uso do sistema pode aumentar a adesão do paciente, que são os grandes motivadores da aplicação de sistemas de liberação.

Bhatti *et al.* (2013) avaliaram o tratamento com solução comercial de bevacizumabe (25 mg/ml) em humanos com transplante de córnea após aplicação tópica 4 vezes ao dia por 24 semanas. O tratamento realizado promoveu redução da recorrência de neovascularização, contribuindo para aumentar a sobrevida do enxerto. A necessidade de administrações em doses repetidas ressalta a importância do desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada contendo bevacizumabe.

No trabalho realizado por Kim *et al.* (2008) a solução de bevacizumabe a (12,5 mg/ml) foi administrada pela via tópica em humanos duas vezes ao dia durante um período de três meses. No primeiro mês, observou-se uma redução da neovascularização na córnea e a partir do segundo mês foram evidenciados defeitos epiteliais na córnea de alguns pacientes. A redução da frequência de administração da solução de bevacizumabe, por meio da aplicação de um sistema de liberação prolongada poderia reduzir a ocorrência de efeitos adversos.

A solução comercial de bevacizumabe também foi aplicada topicamente em humanos com neovascularização da córnea por Cheng *et al.* (2012) e também por Kim *et al.* (2008). Embora os tratamentos nesses estudos tenham sido de maneira diferente um do outro quanto à posologia, dose e período, ambos observaram a redução da neovascularização das córneas.

6.10.2 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

A avaliação da vascularização foi realizada por determinação do número de vasos em seções coradas com HE ou Fator VIII (**Figura 29**) e os resultados revelam uma redução significativa na formação de vasos sanguíneos nos grupos tratados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

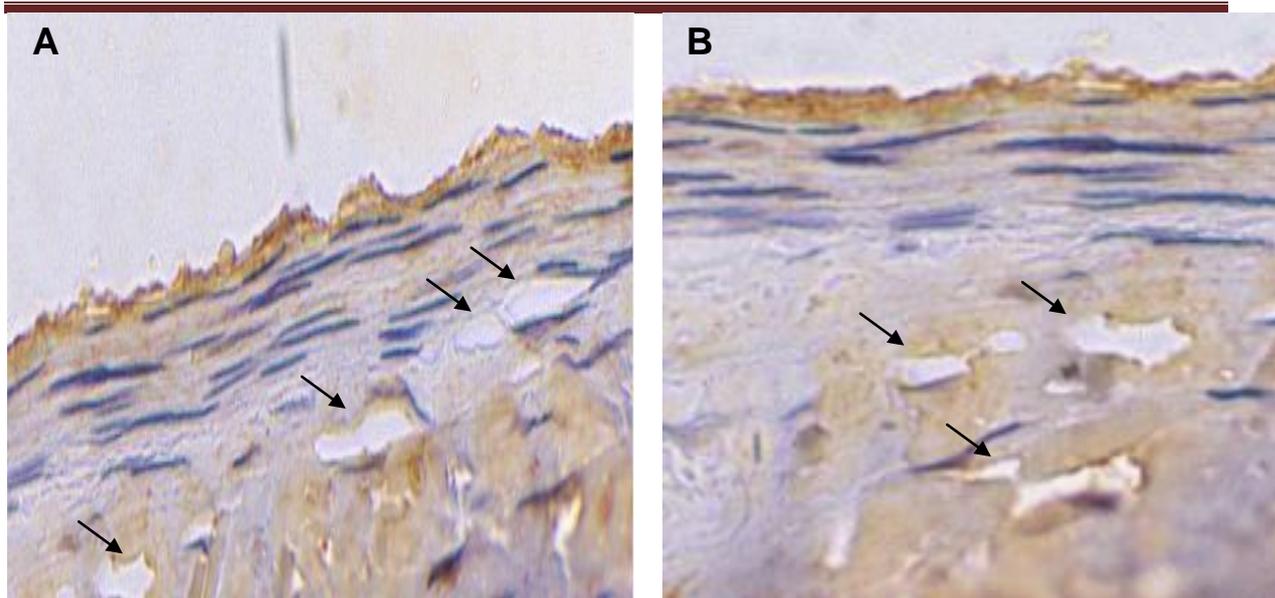


Figura 29 - Fotomicrografia da córnea de coelho com imunomarcção para Fator VIII mostrando pequenos vasos (setas). Sistema polimérico Advance HRP (DAKO) contracorado com Hematoxilina. Grupo controle negativo (PBS) (A) e tratado com o sistema (B).

Na análise pela coloração HE, a densidade média do número de vasos/campos foi reduzida para 48,28% no grupo do sistema quando comparado com o controle negativo (PBS) (**Figura 30**). Quando foi utilizado o Factor VIII, a densidade média do número de vasos/campos foi reduzida para 46,87%. Em ambos os testes, não houve diferença significativa entre o sistema e o grupo solução comercial de bevacizumabe.

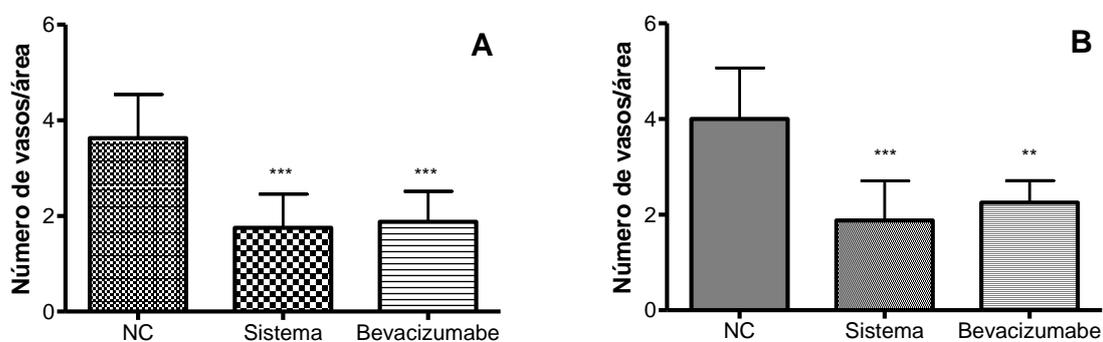


Figura 30 - Número de vasos em seções do tecido da córnea de coelhos, corados com HE (A) e Fator VIII (B) nos grupos: controle negativo (CN), sistema e solução comercial de bevacizumabe. O número total de vasos/campo (densidade microvascular) foi calculado. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=8). Os valores são

RESULTADOS E DISCUSSÃO

significativamente diferentes do grupo NC para sistemas de PUD contendo bevacizumabe e solução comercial de bevacizumabe (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ - Bonferroni).

Dastjerdi *et al.* (2011) aplicaram a solução comercial de bevacizumabe em animais com neovascularização da córnea e com ela intacta. Eles relataram um grande desvio na córnea com neovascularização e também que a penetração do bevacizumabe é dependente do grau de neovascularização da córnea.

O aumento da DMV e da expressão de VEGF estão relacionados com o aumento da angiogênese. De acordo com Willett *et al.* (2004) a solução comercial de bevacizumabe diminuiu a DMV em pacientes com carcinoma retal. Arjaans *et al.* (2013) demonstraram que o tratamento com a solução comercial de bevacizumabe reduziu a DMV em tumores de maneira geral.

A expressão de VEGF foi identificada nos vasos das seções do controle e dos grupos de animais tratados (**Figura 31**). Uma maior intensidade da cor do marcador significa uma maior expressão de VEGF (**Tabela 7**).

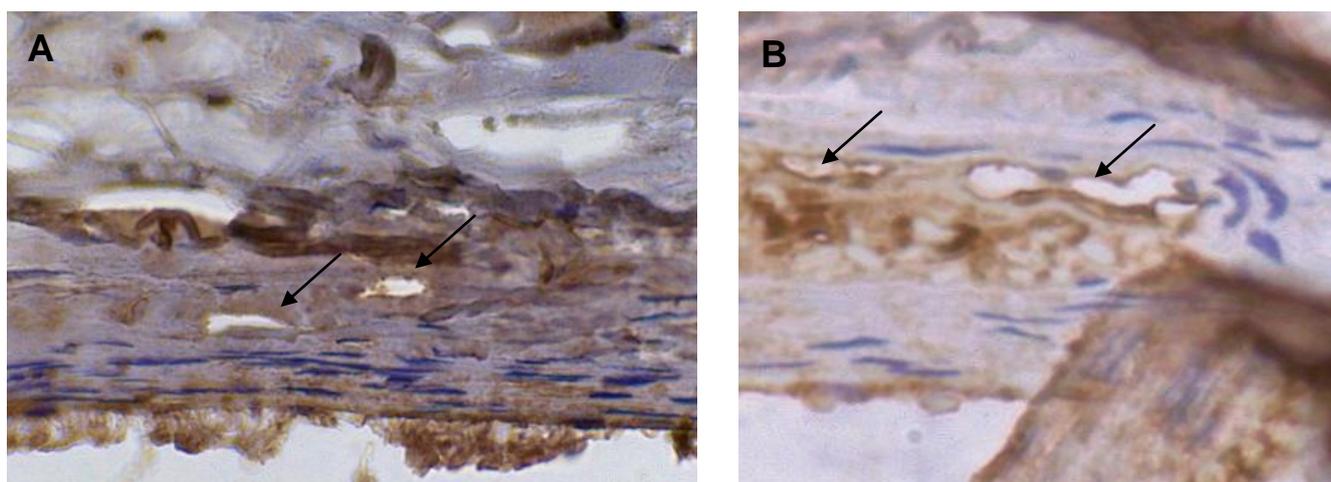


Figura 31 - Fotomicrografia da córnea de coelho com imunomarcção para VEGF mostrando pequenos vasos (setas). Sistema polimérico Advance HRP (DAKO) contracorado com Hematoxilina, após tratamento com a solução comercial de bevacizumabe (A) e o sistema (B).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 7 - Resultado para a expressão de VEGF em córneas de coelhos avaliadas (n = 8)

Expressão de VEGF (escores)*	Controle negativo (PBS)	Sistema	Solução comercial de bevacizumabe
0	0/8	0/8	0/8
+	0/8	4/8	1/8
++	3/8	4/8	5/8
+++	5/8	0/8	2/8

* A intensidade da cor revelou expressão imuno-histoquímica e foi classificada como se segue: (0) total ausência, (+) discreta, (+ +) moderada e (+ + +) forte.

Philipp, Speicher e Humpel (2000) realizaram estudos imunohistoquímicos com 38 córneas humanas e revelaram que o VEGF é expresso por células do epitélio e endotélio da córnea e células endoteliais vasculares dos vasos do limbo. Eles observaram também que a expressão de VEGF e dos seus receptores foi muito aumentada nas córneas inflamadas nas células epiteliais e nas células endoteliais vasculares, em particular na vizinhança de infiltrados de macrófagos, e em fibroblastos de tecido cicatricial.

Os resultados obtidos mostraram que o grupo tratado com o sistema apresentou menor intensidade de cor nos tecidos da córnea, quando comparado com o grupo controle negativo e também com a solução comercial de bevacizumabe. Além da esperada maior expressão de VEGF no grupo controle, também foi observada uma expressão maior no grupo da solução comercial de bevacizumabe, onde a maior parte das córneas dos coelhos apresentou uma coloração moderada e duas apresentaram uma coloração forte. Miyake *et al.* (2010) demonstraram que a concentração de VEGF no humor aquoso em olhos de macacos tratados com injeção intravítrea de bevacizumabe reduziu.

Os resultados obtidos foram capazes de confirmar que o bevacizumabe tópico é adequado para a inibição da neovascularização da córnea em um modelo de

RESULTADOS E DISCUSSÃO

queimadura alcalina em olhos de coelhos. O sistema desenvolvido neste trabalho, contendo 70 ug de bevacizumabe, provou ser eficaz na prevenção da neovascularização, reduzindo-a de maneira similar à solução comercial de bevacizumabe que foi aplicada cinco vezes ao dia, resultando em uma concentração total muito mais elevada que a do sistema. O processo de neovascularização da córnea reduziu sem indução de defeitos epiteliais persistentes após a queimadura química.

Assim como o observado por Dastjerdi *et al.* (2009), que aplicou o bevacizumabe em córneas de humanos com processo de neovascularização estável, o estudo realizado em córnea de coelhos, também não apresentou nenhum efeito adverso local com a utilização do bevacizumabe. O grupo tratado com o sistema também não apresentou nenhum efeito adverso, indicando que ele foi bem tolerado, estando de acordo com o observado no estudo de toxicidade realizado com células ganglionares da retina.

A redução da angiogênese observada nos olhos dos coelhos está de acordo com Papathanassiou *et al.* (2013), que fizeram uma avaliação da eficácia terapêutica do bevacizumabe por meio de uma meta-análise da literatura, que indicou uma significativa redução da neovascularização da córnea humana com a utilização de bevacizumabe.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o sistema biodegradável a base de poliuretano foi capaz de incorporar o bevacizumabe de maneira homogênea e reprodutível. As dispersões aquosas de poliuretanos permitiram a incorporação do anticorpo de maneira rápida, utilizando baixas temperaturas e sem a adição de solventes orgânicos.

As técnicas de caracterização empregadas mostraram que o sistema foi capaz de melhorar a estabilidade do bevacizumabe incorporado, sem modificar significativamente a estrutura do anticorpo. Parece ter ocorrido alguma interação entre os dois, porém essa parece ser reversível, não interferindo na liberação do bevacizumabe do sistema.

Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que o sistema foi capaz de liberar rapidamente $45,26 \pm 1,45\%$ de bevacizumabe em sua forma ativa, mantendo as características do anticorpo e apresentando atividade suficiente para suprimir a neovascularização sem causar toxicidade, mas não apresentou liberação em tempo posterior.

O bevacizumabe liberado estava em sua grande parte na forma monomérica (íntegro) e apenas uma pequena quantidade sugere a formação de moléculas de menor tamanho podendo ser resultado da clivagem do anticorpo. Não foi observada a formação de agregados.

A viabilidade celular não foi reduzida na presença do sistema, sugerindo que ele não é citotóxico.

Estudos *in vivo* empregando o modelo da CAM e de neovascularização da córnea sugeriram que o bevacizumabe manteve a sua atividade antiangiogênica quando incorporado ao sistema. Após a sua liberação do sistema ele foi capaz de reduzir a neovascularização no modelo da CAM em 50,27% e na córnea de coelhos em 46,87% em comparação com o grupo de controlo negativo, mesmo em

CONCLUSÃO

concentrações menores que a do controle positivo e sem apresentar sinais de toxicidade local.

Os estudos sugeriram que o sistema possui potencial para o tratamento de doenças causadoras de neovascularização.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

8 PERSPECTIVAS

Como perspectiva pretende-se melhorar o sistema em relação ao tempo de liberação do fármaco, trabalhando para melhorar as características de adesão do sistema e em seguida realizar estudos de liberação *in vivo* para quantificação do fármaco liberado.

O foco desse trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de liberação contendo bevacizumabe para aplicação tópica, contudo, futuramente o sistema poderá ter outras abordagens terapêuticas como ser inserido no olho e veicular diferentes tipos de fármacos. Por se tratar de um sistema que permite a incorporação de substâncias que necessitam de cuidados especiais como baixas temperaturas, agitação leve e ausência de solventes orgânicos, ele poderá ser também avaliado para a incorporação de proteínas, anticorpos de todas as classes, RNAi e outros biofármacos, que são moléculas que estão ganhando cada vez mais espaço no mercado mundial e tem atraído a atenção da indústria farmacêutica. Com isso ele poderá ser aplicado para o tratamento de diversas doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, F. et al. Anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration: a treat-and-extend protocol over 2 years. **Retina**, v. 0, p. 1 – 8, 2014.

ABRISHAMI, M. et al. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration. **Retina**, v. 29, n. 5, p. 699 – 703, 2009.

AHMED, A. et al. Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. **Clinical & experimental ophthalmology**, v. 37, n. 7, p. 730 – 736, 2009.

AKAR, E. E. et al. Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model. **International journal of ophthalmology**, v. 6, n. 2, p. 136 – 140, 2013.

ALBERTS, B. et al. O sistema imune adaptativo. **Biologia molecular da Célula**, p. 1539 – 1602, 2010.

ARJAANS, M. et al. Bevacizumab-induced normalization of blood vessels in tumors hampers antibody uptake. **Cancer research**, v. 73, n. 11, p. 3347 – 3355, 2013.

ATHAWALE, V. D.; KULKARNI, M. A. Polyester polyols for waterborne polyurethanes and hybrid dispersions. **Progress in Organic Coatings**, v. 67, n. 1, p. 44–54, 2010.

AUERBACH, W.; AUERBACH, R. Angiogenesis inhibition: a review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 63, p. 265 – 311, 1994.

AVISAR, I.; WEINBERGER, D.; KREMER, I. Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injections on corneal neovascularization in a mouse model. **Current eye research**, v. 35, n. 2, p. 108 – 115, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYRES, E.; ORÉFICE, R. L.; YOSHIDA, M. I. Phase morphology of hydrolysable polyurethanes derived from aqueous dispersions. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3510 – 3521, 2007.

BAINBRIDGE, J. et al. Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. **Gene Therapy**, v. 9, p. 320–326, 2002.

BARKANA, Y.; BELKIN, M. Laser eye injuries. **Survey of ophthalmology**, v. 44, n. 6, p. 459 – 478, 2000.

BEEBE, D. C. Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 19, n. 2, p. 125–33, 2008.

BENAYOUN, Y. et al. Néovascularisation cornéenne : aspects épidémiologiques, physiopathologiques et cliniques. **Journal français d'ophtalmologie**, v. 36, p. 627–639, 2013.

BHATTI, N. et al. Efficacy of topical bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. **Pakistan journal of medical sciences**, v. 29, n. 2, p. 519–22, 2013.

BRATS. Boletim brasileiro de avaliação de tecnologias em saúde. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, p. 1–13, 2008.

BURGES R. RICHARD; DEUTSCHER, M. P. (EDS.). Guide to Protein Purification. In: **Methods in enzymology**. 2º. ed. San Diego: Elsevier, 2009. p. 851.

BURT, H. M. et al. Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid). **Cancer letters**, v. 88, p. 73 – 79, 1995.

CAKIC, S. M. et al. Synthesis and degradation profile of cast films of PPG-DMPA-IPDI aqueous polyurethane dispersions based on selective catalysts. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 11, p. 2015 – 2022, 2009.

CHEN, T.; OAKLEY, D. M. Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest. **Thermochimica acta**, v. 248, p. 229 –244, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHENG, S.-F. et al. Short-term topical bevacizumab in the treatment of stable corneal neovascularization. **American journal of ophthalmology**, v. 154, n. 6, p. 940 – 948, 2012.

CHERNG, J. Y. et al. Polyurethane-based drug delivery systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 450, n. 1-2, p. 145–62, 2013.

CHIA-WEI, C.; LU, K.-T. Natural castor oil based 2-package waterborne polyurethane wood coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 75, n. 4, p. 435–443, 2012.

COUTINHO, F. M. B.; DELPECH, M. C. Degradation profile of films cast from aqueous polyurethane dispersions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 70, p. 49 – 57, 2000.

CRAWFORD, D. M.; BASS, R. G.; HAAS, T. W. Strain effects on thermal transitions and mechanical properties of thermoplastic polyurethane elastomers. **Thermochimica Acta**, v. 323, p. 53 – 63, 1998.

CURSIEFEN, C. et al. Impact of short-term versus long-term topical steroids on corneal neovascularization after non-high-risk keratoplasty. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 239, n. 7, p. 514 – 521, 2001.

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

DAS, A.; MCGUIRE, P. G. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, n. 6, p. 721–748, 2003.

DASTJERDI, M. H. et al. Topical Bevacizumab in the Treatment of Corneal Neovascularization. **Archives of ophthalmology**, v. 127, n. 4, p. 381 – 389, 2009.

DASTJERDI, M. H. et al. Corneal penetration of topical and subconjunctival bevacizumab. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 52, n. 12, p. 8718 – 8723, 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVIS-SILBERMAN, N.; ASHERY-PADAN, R. Iris development in vertebrates; genetic and molecular considerations. **Brain research**, v. 1192, p. 17–28, 2008.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. (EDS.). **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. p. 60

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **Journal of cataract and refractive surgery**, v. 37, n. 3, p. 588 – 598, 2011.

DESTAFENO, J. J.; KIM, T. Topical Bevacizumab Therapy for Corneal Neovascularization. **Archives of ophthalmology**, v. 125, n. 6, p. 834 – 836, 2007.

ELVIN, J. G.; COUSTON, R. G.; VAN DER WALLE, C. F. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. **International journal of pharmaceuticals**, v. 440, n. 1, p. 83 – 98, 2013.

EUBANK, T. D. et al. M-CSF induces vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity from human monocytes. **Journal of immunology**, v. 171, n. 5, p. 2637–43, 2003.

FDA. **Avastin**. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm080453.pdf>>. Acesso em: 8 mar. 2014.

FEKETE, S. et al. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 74 – 83, 2013.

FERRARI, G. et al. Topical Ranibizumab as a Treatment of Corneal Neovascularization. **Cornea**, v. 32, n. 7, p. 992 – 997, 2013.

FORATO, L. A.; CARLOS BERNARDES, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de ftir para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 146 – 150, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GERBER, H.-P.; FERRARA, N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. **Cancer research**, v. 65, n. 3, p. 671 – 680, 2005.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1834, n. 12, p. 2849 – 2858, 2013.

GOMES, E. C. DE L. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do fármaco bevacizumabe por cromatografia a líquido de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 608 – 611, 2012.

GROTEFEND, S. et al. Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 71, p. 127 – 138, 2012.

GUZMAN-ARANGUEZ, A.; LOMA, P.; PINTOR, J. Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy. **British journal of pharmacology**, v. 170, n. 4, p. 730 – 747, 2013.

HABOT-WILNER, Z. et al. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. **Acta ophthalmologica**, v. 88, n. 8, p. 862 – 867, 2010.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (EDS.). **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 12°. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012. p. 2112

HOSSEINI, H.; NEJABAT, M. A potential therapeutic strategy for inhibition of corneal neovascularization with new anti-VEGF agents. **Medical hypotheses**, v. 68, n. 4, p. 799 – 801, 2007.

HUI-KANG, D. et al. Matrix Revolution: Molecular Mechanism for Inflammatory Corneal Neovascularization and Restoration of Corneal Avascularity by Epithelial stem Cell Transplantation. **The Ocular Surface**, v. 7, n. 3, p. 128 – 144, 2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IANNETTI, L. et al. Treatment of corneal neovascularization in ocular chemical injury with an off-label use of subconjunctival bevacizumab: a case report. **Journal of medical case reports**, v. 7, n. 1, p. 1 – 3, 2013.

IONESCU, R. M. et al. Contribution of Variable Domains to the Stability of Humanized IgG1 Monoclonal Antibodies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1414 – 1426, 2008.

ISHIKAWA, T. et al. Influence of pH on heat-induced aggregation and degradation of therapeutic monoclonal antibodies. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 8, p. 1413 – 1417, 2010.

JIMÉNEZ-ORTIZ, H. F. et al. Intracameral bevacizumab (Avastin®) in the management of neovascular glaucoma surgery. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v. 87, n. 12, p. 396 – 400, 2012.

JIN-HONG, C. et al. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. **Survey of ophthalmology**, v. 57, n. 5, p. 415 – 429, 2012.

KIM, J.; HOLLINGER, J. O. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 released from polyurethane-based scaffolds promotes early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Biomedical materials**, v. 7, n. 4, p. 1 – 9, 2012.

KIM, J. Y. et al. Topically administered bevacizumab had longer standing anti-angiogenic effect than subconjunctivally injected bevacizumab in rat corneal neovascularization. **International journal of ophthalmology**, v. 6, n. 5, p. 588 – 591, 2013.

KIM, J.-H. et al. The effect of bevacizumab versus ranibizumab in the treatment of corneal neovascularization: a preliminary study. **Korean journal of ophthalmology : KJO**, v. 27, n. 4, p. 235 – 242, 2013.

KIM, S. W. et al. The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization. **Ophthalmology**, v. 115, n. 6, p. 33 – 38, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KIM, W.-J.; JEONG, H.-O.; CHUNG, S.-K. The effect of bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. **Korean journal of ophthalmology**, v. 24, n. 4, p. 230 – 236, 2010.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable Polymers for. **Ophthalmologica**, v. 215, p. 143–155, 2001.

KOENIG, Y. et al. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin) eye drops against corneal neovascularization. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology**, v. 247, n. 10, p. 1375 – 1382, 2009.

KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549 – 559, 2007.

KRAUSS, J. M.; PULIAFITO, C. A.; STEINERT, R. F. Laser Interactions With the Cornea. **Survey of Ophthalmology**, v. 31, n. 1, p. 37 – 53, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LEE, P.; WANG, C. C.; ADAMIS, A. P. Ocular Neovascularization : An Epidemiologic Review. **Survey of Ophthalmology**, v. 43, n. 3, p. 245 – 269, 1998.

LEE, S. H. et al. Bevacizumab accelerates corneal wound healing by inhibiting TGF-beta2 expression in alkali-burned mouse cornea. **BMB reports**, v. 42, n. 12, p. 800 – 805, 2009.

LIU, H.; GAZA-BULSECO, G.; LUNDELL, E. Assessment of antibody fragmentation by reversed-phase liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 876, n. 1, p. 13 – 23, 2008.

LOWE, J. et al. Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. **Experimental eye research**, v. 85, n. 4, p. 425 – 430, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MADDULA, S. et al. Horizons in Therapy for Corneal Angiogenesis. **Ophthalmology**, v. 118, n. 3, p. 591 – 599, 2011.

MAEDA, K. et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **British journal of cancer**, v. 72, n. 2, p. 319 – 323, 1995.

MAHLER, H.-C. et al. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 9, p. 2909 – 2934, 2009.

MALHOTRA, A. et al. Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. **Seminars in ultrasound CT and MRI**, v. 32, n. 1, p. 2 – 13, 2011.

MANZANO, R. P. A et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). **The British journal of ophthalmology**, v. 91, p. 804 – 807, 2007.

MELLO, G. H. R. et al. Ação do bevacizumabe subconjuntival na neovascularização e re-epitelização corneana 25 dias após queimadura química. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 74, n. 1, p. 48 – 52, 2011.

MIYAKE, T. et al. Pharmacokinetics of bevacizumab and its effect on vascular endothelial growth factor after intravitreal injection of bevacizumab in macaque eyes. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 3, p. 1606 – 1608, 2010.

MOISSEIEV, E. et al. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical and intravitreal administration in human eyes. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology**, v. 252, n. 2, p. 331 – 337, 2014.

MOLOKHIA, S. A et al. The capsule drug device: novel approach for drug delivery to the eye. **Vision research**, v. 50, n. 7, p. 680 – 685, 2010.

MOULD, D. R.; SWEENEY, K. R. D. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies--mechanistic modeling applied to drug development. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 10, n. 1, p. 84–96, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NAVAS, N. et al. Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 29, p. 9351 – 9363, 2013.

NG, E. W. M. et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 2, p. 123 – 132, 2006.

OLIVEIRA, H. B. et al. VEGF TrapR1R2 suppresses experimental corneal angiogenesis. **European Journal of Ophthalmology**, v. 20, n. 1, p. 48 – 54, 2010.

PACE, C. N. et al. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1448, p. 1225 – 1235, 2004.

PAPATHANASSIOU, M. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Inhibitors for Treatment of Corneal Neovascularization: A Meta-Analysis. **Cornea**, v. 32, n. 4, p. 435 – 444, 2013.

PARK, D. et al. An anti-angiogenic reverse thermal gel as a drug-delivery system for age-related wet macular degeneration. **Macromolecular bioscience**, v. 13, n. 4, p. 464 – 469, 2013.

PAUL, M. et al. Long-term stability of bevacizumab repackaged in 1mL polypropylene syringes for intravitreal administration. **Annales pharmaceutiques françaises**, v. 70, n. 3, p. 139 – 154, 2012.

PAULA, J. S. et al. Bevacizumab-loaded polyurethane subconjunctival implants: effects on experimental glaucoma filtration surgery. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 29, n. 6, p. 566 – 573, 2013.

PEREZ, A. C. et al. Assessing the maxillary sinus mucosa of rabbits in the presence of biodegradable implants. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 6, p. 40 – 46, 2012.

PERRIE, Y. et al. The impact of ageing on the barriers to drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 2, p. 389 – 398, 2012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PHILIPP, W.; SPEICHER, L.; HUMPEL, C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 41, n. 9, p. 2514 – 2522, 2000.

PILLAI, C. T.; DUA, H. S.; HOSSAIN, P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 41, n. 8, p. 2148 – 2153, 2000.

PINTO, F. C. H. et al. Controlled release of triamcinolone acetonide from polyurethane implantable devices: application for inhibition of inflammatory-angiogenesis. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 23, n. 6, p. 1431 – 1445, 2012.

QAZI, Y.; MADDULA, S.; AMBATI, B. K. **Mediators of ocular angiogenesis. Journal of genetics**, 2009. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703029>>

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, p. 1 – 21, 2004.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. (EDS.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5^o. ed. Grayslake: Pharmaceutical Press, 2006. p. 918

ROY, A A; DAVAGNANAM, I.; EVANSON, J. Abnormalities of the globe. **Clinical radiology**, v. 67, n. 10, p. 1011 – 1022, 2012.

RUFER, F.; SCHRÖDER, A.; ERB, C. White-to-White Corneal Diameter. **Cornea**, v. 24, n. 3, p. 259 – 261, 2005.

SAETTONE, M. F.; SALMINENB, L. Ocular inserts for topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 95 – 106, 1995.

SANTOS, M. S. et al. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. **American journal of ophthalmology**, v. 140, n. 2, p. 223 – 230, 2005.

SEMERARO, F. et al. Aflibercept in wet AMD: specific role and optimal use. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 711 – 722, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

SILVA-CUNHA, A. et al. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 66, p. 385 – 391, 2003.

SIVAKUMAR, P. M. et al. Chalcone embedded polyurethanes as a biomaterial: Synthesis, characterization and antibacterial adhesion. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 353–360, 2012.

STATON, C. A. et al. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. **International journal of experimental pathology**, v. 85, p. 233 – 248, 2004.

STEFANINI, F. R.; AREVALO, J. F.; MAIA, M. Bevacizumab for the management of diabetic macular edema. **World journal of diabetes**, v. 4, n. 2, p. 19 – 26, 15, 2013.

STEVENSON, W. et al. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin). **The ocular surface**, v. 10, n. 2, p. 67 – 83, 2012.

TIAN, F.; SANE, S.; RYTTING, J. H. Calorimetric investigation of protein/amino acid interactions in the solid state. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p. 175 – 186, 2006.

URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 11, p. 1131 – 1135, 2006.

VAIKOUSSIS, E.; BISOGIANNIS, Z.; MARGARITIS, L. Corneal endothelial damage after Nd:YAG laser anterior capsulotomy. An experimental study on rabbits. **Documenta ophthalmologica**, v. 83, n. 4, p. 279 – 286, 1993.

VARSHOCHIAN, R. et al. The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 50, n. 3-4, p. 341 – 352, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VERMEDI, P.; POPEL, A. S.; MAC GABHANN, F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 1, p. 1 – 19, 2014.

VENTURELLI, E. et al. Antibody covalent immobilization on carbon nanotubes and assessment of antigen binding. **Small**, v. 7, n. 15, p. 2179 – 2187, 2011.

VERMEER, A. W.; BREMER, M. G.; NORDE, W. Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1425, n. 1, p. 1 – 12, 1998.

VERMEER, A. W. P.; NORDE, W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. **Biophysical journal**, v. 78, n. 1, p. 394 – 404, j2000.

VLASAK, J.; IONESCU, R. Fragmentation of monoclonal antibodies. **mAbs**, v. 3, n. 3, p. 253 – 263, 2011.

WANG, C. B.; COOPER, S. L. Morphology and Properties of Segmented Polyether Polyurethaneureas. **Macromolecules**, v. 16, p. 775–786, 1983.

WANG, C.-H. et al. Extended release of bevacizumab by thermosensitive biodegradable and biocompatible hydrogel. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 40 – 48, 2012.

WANG, D. et al. Immunohistochemistry for the evaluation of angiogenesis in tumor xenografts. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 83, n. 3, p. 179 – 189, 2008.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International journal of pharmaceuticals**, v. 203, n. 1-2, p. 1 – 60, 2000.

WANG, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. **International journal of pharmaceuticals**, v. 289, p. 1–30, 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WANG, W.; NEMA, S.; TEAGARDEN, D. Protein aggregation-pathways and influencing factors. **International journal of pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 89 – 99, 2010.

WEN, T.-C. et al. The effect of DMPA units on ionic conductivity of PEG–DMPA–IPDI waterborne polyurethane as single-ion electrolytes. **Polymer**, v. 40, n. 14, p. 3979 – 3988, 1999.

WHA, W. H. A. **Towards universal eye health : a global action plan 2014 – 2019** Switzerland 66th World Health, , 2013. Disponível em:
<<http://www.who.int/blindness/ResolutionWHA66.pdf>>

WHITELEY, H. E.; PEIFFER, R. L. The Eye. In: **Handbook of Toxicologic Pathology**. 2º. ed. [s.l.] Academic P, 2002. p. 539 – 584.

WHO. **Global data on visual impairments 2010**. World Health Organization, 2012.

WILLETT, C. G. et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. **Nature medicine**, v. 10, n. 2, p. 145 – 147, 2004.

WILSON, B. C. Photodynamic therapy for cancer: principles. **Canadian journal of gastroenterology**, v. 16, n. 6, p. 393 – 396, 2002.

XIA, J. et al. Design strategy for waterborne polyurethane with sodium sulfonate groups on the soft segments. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 1, p. 1 – 6, 2014.

YANDRAPU, S. K. et al. Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 12, p. 4676 – 4686, 2013.

YOERUEK, E. et al. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. **Acta ophthalmologica**, v. 86, n. 3, p. 322 – 328, 2008.