

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

JULIANA BARBOSA SALIBA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS
CONTENDO *CICLOSPORINA (A)* DE ADMINISTRAÇÃO
INTRAVÍTREA**



BELO HORIZONTE

2011

JULIANA BARBOSA SALIBA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS
CONTENDO *CICLOSPORINA (A)* DE ADMINISTRAÇÃO
INTRAVÍTEA**

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior – UFMG.

Co-orientador:

Prof. Dr. Herman Sander Mansur – UFMG.

BELO HORIZONTE

2011

“ Mapa de Anatomia: O Olho

*O Olho é uma espécie de globo,
é um pequeno planeta
com pinturas do lado de fora.*

*Muitas pinturas:
azuis, verdes, amarelas.*

*É um globo brilhante:
parece cristal,
é como um aquário com plantas
finamente desenhadas: algas, sargaços,
miniaturas marinhas, areias, rochas, naufrágios
e peixes de ouro.*

*Mas por dentro há outras pinturas,
que não se veem:
umas são imagem do mundo,
outras são inventadas.*

*O Olho é um teatro por dentro.
E às vezes, sejam atores, sejam cenas,
e às vezes, sejam imagem, sejam ausências,
formam, no Olho, lágrimas” .*

Cecília Meireles

DEDICATÓRIA

À minha família pela presença e sempre carinho em apoiar os meus projetos de vida e trajetória de estudos, além de forças e ouvidos para concluir essa etapa,

Especialmente ao Prof. Dr. Armando, meu orientador e exemplo profissional, pela amizade e dedicação imensurável ao longo desses anos, por me encorajar na busca dos desafios e aconselhar como vencer os obstáculos e, principalmente, por mostrar o real propósito da ciência e os caminhos a seguir para a construção de minha carreira como pesquisadora,

E à Deus por proporcionar em minha vida essa oportunidade tão especial.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Herman, meu co-orientador, pelo apoio e pelos conselhos essenciais para o enriquecimento deste trabalho e na minha trajetória profissional,

Ao Prof. Dr. Gerson Pianetti coordenador do Centro de Desenvolvimento Analítico Farmacêutico da UFMG por permitir a utilização do equipamento de espectroscopia de massa,

Ao Prof. Dr. André Messias e ao Dr. Felipe de Almeida pela realização dos estudos *in vivo*, pela atenção incondicional e pela colaboração na compreensão de temas por mim até então desconhecidos,

À Profa. Dra. Francine Behar-Cohen diretora da Equipe 17 do INSERM (*Institute Nationale de la Santé e de la Recherche Medicale / Paris*) por me acolher em seu laboratório e por permitir adquirir conhecimentos, até então por mim inalcançáveis,

Aos colegas do INSERM pelo companheirismo durante a minha estada em Paris, em especial à Brigitte Goldenberg, Elodie Bousquet e Naïma Chalour pela amizade e dedicação nos momentos que mais precisava,

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFMG, pelo carinho, apoio nos momentos mais difíceis e pelos momentos agradáveis por mim vividos no laboratório,

Ao Ricardo Byrro pela sua importante participação na realização deste trabalho, em especial pela sua sincera amizade ao longo desses anos e pelo seu imensurável apoio,

À amiga Danielle Arruda sempre presente no decorrer na finalização deste trabalho,

À minha mãe pelo conhecimento profissional e ao meu pai pelas sugestões e críticas.

RESUMO

SALIBA, J.B. **Avaliação biológica de implantes biodegradáveis contendo *ciclosporina (A)* de administração intravítrea.** 2011, 152p. Tese (Doutorado), Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

O tratamento da uveíte posterior é limitado uma vez que as formas convencionais de administração de fármacos falham ao disponibilizar doses terapêuticas no vítreo, retina e coróide. Os implantes intraoculares biodegradáveis são capazes de disponibilizar o fármaco diretamente na cavidade vítrea em doses terapêuticas e por um período prolongado. O copolímero do ácido lático e glicólico é um clássico exemplo entre os polímeros sintéticos biodegradáveis e bem aplicados em sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade em testes *in vivo*. Visando o desenvolvimento de um novo sistema para tratar a doença resistente à terapia com corticoides, o estudo realizado avaliou a viabilidade e a segurança da utilização de implantes biodegradáveis obtidos a partir do copolímero do ácido lático e glicólico (PLGA 75:25) e do imunossupressor *Ciclosporina A* (CsA) previamente desenvolvido por nosso grupo. A metodologia desenvolvida e validada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao detector de Espectroscopia de Massa (EM) mostrou-se adequada para quantificação de CsA no vítreo na ordem de nanogramas. O sistema desenvolvido apresentou um perfil de liberação *in vivo* característico de sistemas de liberação prolongada (SLP) onde apenas 42,8% de CsA foi liberada e 22,8% da matriz foi degradada em oito semanas. A partir do estudo *in vivo* foi possível mostrar que a liberação da CsA é regida pelas etapas primárias e secundárias de liberação. A análise matemática por meio do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas demonstrou que a liberação do fármaco acontece primordialmente pela difusão da molécula a partir da matriz polimérica intumescida e porosa. Adicionalmente, foi estimado que o tempo de permanência da CsA na cavidade vítrea é de dezessete semanas ao determinar o tempo de meia vida de 69,3 dias e a taxa de eliminação constante de 3µg por dia, quantidade consideravelmente menor que àquela distribuída no organismo quando o fármaco é administrado por via oral e sistêmica. O exame realizado no microscópio de luz evidenciou a integridade dos constituintes do bulbo do olho e ausência de qualquer manifestação inflamatória. Já a análise histopatológica confirmou a manutenção da estrutura e organização do tecido da retina quando o sistema se encontra suspenso no vítreo viscoso. Entretanto, certa alteração na função retiniana foi observada por eletrorretinograma (ERG) ao se detectar a supressão significativa na amplitude das ondas B em olhos de animais que receberam o implante contendo a CsA. A partir da injeção intravítrea do fármaco em dose superior à terapêutica foi possível classificar a toxicidade como transitória já que esta foi revertida doze dias após a total eliminação do fármaco.

Palavras-chave: Sistema de liberação de fármacos; Ciclosporina A, Implante biodegradável intraocular; Farmacocinética; Toxicidade retiniana.

ABSTRACT

SALIBA, J.B. **Biological evaluation of Cyclosporine A – loaded biodegradable implants of intravitreal administration.** 2011, 152p. Thesis (Doctoral), Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

The treatment of posterior ocular disease is limited once the conventional forms of drug administration fail to provide therapeutic levels drug to the vitreous, retina and choroids. The biodegradable polymers intraocular implants are able to release drugs directly to the vitreous and are able to maintain long-term vitreous concentration of drugs in therapeutic range. The poly (D,L–lactide–co–glycolide) is a classic example amongst the synthetic polymers and well applied as drug delivery system due to its satisfactory degradability, biocompatibility and absence of significant toxicity in vivo studies. Aiming the development of a new system to treat posterior uveitis that is not treated with corticoids therapy, this study has evaluated the viability and safety of an biodegradable implants based on poly (D,L–lactide–co–glycolide) (PLGA 75:25) and the Cyclosporine A (CyA) previously developed. The validated method applying Mass Spectroscopy detector (MS) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed to be suitable to quantify the concentrations of CyA in the vitreous on the order of nanograms. The system presented a drug delivery profile (DDS) where 42,8% of CyA were delivered and 22,8% of matrix mass were lost in eight weeks. From the *in vivo* delivery study, it was possible to show that the drug delivery was determined by the first and second drug delivery pathways. The Korsmeyer-Peppas mathematical model analysis demonstrated that the drug delivery occurs mainly due to the drug diffusion from the swelling and porous polymeric matrices. Additionally, it was estimated the CyA permanence period in the vitreous of seventeen weeks once it was founded the CyA half-life of 69,3 days and the CyA elimination constant rate of 3 µg per day, a lower quantity as compared to the therapeutically CyA doses provide in the systemic administration. The light microscopy analysis showed the eye integrity constituents and the absence of any inflammatory manifestation. In addition, the histology findings confirmed the maintenance of the structure and organization of the retinal tissue when the system is suspended in the vitreous viscous. However, some retinal function alteration was observed by the electrophysiological studies (ERG) once it was detected the B wave suppression in the eye that received the implants containing the CyA. From the CyA intravitreal injection of in a highest therapeutically dose, it was possible to classify this toxicity as a transitory behavior once it was reverted twelve days after the totally drug elimination.

Keywords: Drug Delivery System; Cyclosporine A; Intraocular biodegradable implants; Pharmacokinetic; Retinal toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Corte sagital de um olho humano. No esquema ilustrativo são indicados:1) limbo esclero corneano, 2) câmara posterior, 3) câmara anterior e 4) humor aquoso.....	25
FIGURA 2 -	Visão externa do olho.....	28
FIGURA 3 -	Representação esquemática do ângulo irido-corneano. O ângulo irido-corneano é a zona de transição entre a córnea, esclera, íris e corpo ciliar responsável pela circulação do humor aquoso. A trabécula esta situada no limbo, zona de transição da córnea transparente e esclera opaca. Sua distribuição é semelhante à aglomerados de orifícios circulares.....	29
FIGURA 4 -	Microestrutura do humor vítreo. O alinhamento do colágeno e aminoglicosmantêm a rigidez e estabilidade do gel e controlam a difusão de moléculas.....	32
FIGURA 5 -	Estrutura e organização da retina. (a) Esquema de uma seção sagital do olho humano. SA: segmento anterior; SP: segmento posterior. (b) Corte histológico da retina orientado de acordo com o trajeto da luz. (c) Esquema da retina.....	33
FIGURA 6 -	Morfologia dos receptores e diagrama da foto-transdução. (a) Esquema dos fotorreceptores. (b) Estrutura molecular da rodopsina. (c) Cascata dos segundos mensageiros na foto-transdução.....	34
FIGURA 7 -	Funcionamento simplificado da detecção dos sinais elétricos da neuroretina pelo eletroretinograma (ERG). (I) representação dos eletrodos conectados ao olho: (C), eletrodo positivo, catodo; (B, A, E, D) eletrodos negativos, anodo. (II) representação da transmissão do sinal elétrico e as resistências utilizadas para cada ponto A, B, C e E. (III) esquema ilustrativo da retina neuronal: (a) cones; (ba) bastonetes, (b) bipolares; (OP) células horizontais. (IV) sinais originados pelo ERG.....	36
FIGURA 8 -	Esquema representativo da barreira hematorretiniana (BHR) responsável pelo transporte de moléculas do vaso sanguíneo à neuroretina.....	38
FIGURA 9 -	Vias de absorção ocular. Rotas de penetração ocular de fármacos após administração tópica, sistêmica e intravitreal. As principais vias de eliminação estão indicadas pela seta escura. As barreiras oculares: BHR E/I, barreira hematorretiniana externa / interna; BHA, barreira hemato-aquosa.....	40

FIGURA 10 -	Classificação anatômica da uveíte. A uveíte anterior compromete a íris e corpo ciliar. A uveíte intermediária trata-se da inflamação da porção posterior do corpo ciliar e da retina periférica. A ocorrência da uveíte posterior é limitada a processos inflamatórios que comprometem a coroide, retina e humor vítreo. Raramente ocorre a manifestação da uveíte difusa, esta que se manifesta em todo o bulbo ocular.....	42
FIGURA 11 -	Esquema das funções efetoras e dos linfócitos auxiliares diferenciados.....	44
FIGURA 12 -	Barreiras oculares e as vias de administração. No esquema são indicados: 1, córnea: 1a, epitélio; 1b, estroma; 1c, endotélio; 2, humor aquoso; 3, íris; 4, corpo ciliar; 5, cristalino; 6, vítreo; 7, retina; 8, coroide, 9, nervo óptico. (a) administração tópica, (c) injeção intravítrea, (d) injeção transescleral e (e) injeção subretiniana.....	46
FIGURA 13 -	Estrutura química do copolímero ácido poli (D,L-lático-glicólico). (m) e (n) representam inúmeros meros do ácido lático e glicólico, respectivamente que definem a massa molecular do copolímero e as suas propriedades termoplástica.....	52
FIGURA 14 -	Mecanismo de hidrólise do PLA, PGA ou PLGA. * Os produtos de degradação: ácido lático (caso o polímero seja PLA), ácido glicólico (polímero de origem PGA) e ambos (polímero de origem PLGA).....	53
FIGURA 15 -	Período de ação de diferentes sistemas de liberação de fármacos aplicados no tratamento de doenças oftálmicas do segmento posterior.....	54
FIGURA 16 -	Processos de obtenção do implante biodegradável em diferentes formas.....	58
FIGURA 17 -	Mecanismos de liberação de fármacos e biodegradação da matriz polimérica. (a) Gráfico ilustrativo da liberação acumulada versus tempo a partir do implante composto de PLGA. (b) implante polimérico antes da implantação mostrando uma matriz homogênea e porosa. (c) A ocorrência do burst inicial logo após a implantação, molécula do fármaco (vermelho) e penetração da água (azul). (d) fase de difusão do fármaco pela matriz intumescida e cisão da cadeia. (e) biodegradação e início da erosão da matriz. (f) Degradação da matriz e consequente alteração do formato do implante. (g) Fragmentação do implante e o fim da biodegradação.....	59

FIGURA 18 -	Estrutura plana e tridimensional da CsA. (a) representação do esqueleto molecular. (b) representação da estrutura tridimensional da CsA.....	64
FIGURA 19 -	Representação: (a) da ativação de linfócitos T e (b) do mecanismo de ação da CsA.....	67
FIGURA 20 -	Fotografia dos implantes obtidos.....	85
FIGURA 21 -	Procedimento de inserção do implante intraocular: (a) O implante polimérico a ser inserido na cavidade vítrea, (b) Trocater Transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA), (c) e (d) Procedimento cirúrgico de inserção dos implantes intraoculares na cavidade vítrea do bulbo do olho dos coelhos.....	86
FIGURA 22 -	O Eletroretinograma (ERG). (a) posicionamento do animal para o exame da função retiniana, (b) o eletrodo colocado na superfície ocular.....	94
FIGURA 23 -	Espectro de massas com fonte de eletrospray (ESI/EM): (a) da CSA, (b) dos fragmentos de CsA.....	99
FIGURA 24 -	Espectro de massas com fonte de eletrospray (ESI/EM): (a) do TMX, (b) dos fragmentos de TMX.....	100
FIGURA 25 -	Cromatograma obtido de análise por cromatografia líquida com espectrometria de massas (CLAE/EM) dos constituintes do vitreo (a), da CsA (b) e TMX (C).....	103
FIGURA 26 -	Gráficos das curvas dos testes de linearidade.....	104
FIGURA 27 -	Cromatograma demonstrativo do sinal/ruído para a concentração de 20 ng/mL de CsA.....	107
FIGURA 28 -	Perfil de liberação da CsA no estudo <i>in vivo</i>	111
FIGURA 29 -	Relação entre porcentagem de perda de massa polimérica <i>versus</i> o tempo de estudo <i>in vivo</i>	112
FIGURA 30 -	Gráficos relacionando a porcentagem acumulada de CsA liberada no vítreo e o tempo no estudo <i>in vivo</i> segundo o modelo de Higuchi. A análise exponencial está representada pelas linhas pontilhadas.....	114
FIGURA 31 -	Gráficos relacionando o logaritmo da porcentagem acumulada de CsA liberada e o tempo no estudo <i>in vivo</i> segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas. A análise logarítmica está representada pelas linhas pontilhadas.....	115

FIGURA 32 -	Esquema ilustrativo dos parâmetros farmacocinéticos da CsA a partir do implante intraocular. Em um determinado tempo (t), certa quantidade de CsA é liberada ($C_{(0)}$), difunde para retina, humor aquoso, íris ou copo ciliar e é eliminada ($C_{(t)}$) pela barreira hemato-aquosa e hematorretiniana (Hornof et al., 2005) até atingir uma concentração remanescente na ordem de nanogramas. Este processo é contínuo até total liberação do fármaco presente no sistema.....	121
FIGURA 33 -	Estimativa da quantidade de CsA presente no vítreo (n=3). Os valores representam à média e desvio padrão de quatro determinações. (*) concentração máxima de 19,3 ng/mL de CsA no vítreo. (**) diferença estatística obtida pelo método paramétrico One-way ANOVA.....	122
FIGURA 34 -	Perfil farmacocinético durante sete semanas de estudo <i>in vivo</i> : porcentagem de eliminação vítrea da CsA. Os valores representam a média e desvio padrão de quatro determinações.....	122
FIGURA 35 -	Gráfico relacionando a estimativa da concentração de CsA presente no vítreo $C(t)$ e o tempo de estudo <i>in vivo</i> em dias para cada semana. Valores obtidos por meio da taxa de eliminação de 3 $\mu\text{g}/\text{dia}$ determinada experimentalmente. A análise exponencial está representada pela linha sólida.....	125
FIGURA 36 -	Fotografia do implante devidamente inserido na cavidade vítrea no olho do coelho. Observa-se a ausência aparente de danos à estrutura ocular.....	128
FIGURA 37 -	- Análise histopatológica da retina e coroide de olho de coelho oito semanas após a implantação do implante polimérico com (b) e sem a CsA. (c) e o controle (a). Aumento de 20X.....	129
FIGURA 38 -	Análise histopatológica da retina e coroide de olho de coelho oito semanas após a implantação do implante polimérico com (b) e sem a CsA. (c) e o controle (a). Aumento de 20X.....	131
FIGURA 39 -	Avaliação do período de reestabelecimento da normalidade da amplitude de onda B quando 35 μg de CsA são injetados na cavidade vítrea. (*) diferença estatística obtida pelo método paramétrico One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey ($p < 0,5$).....	132

LISTA DE TABELAS

1 -	Resultados da validação do analito.....	101
2 -	Resultados do teste de efeito de matriz do método.....	102
3 -	Resultado da exatidão do método.....	105
4 -	Resultado do limite de quantificação inferior do método.....	106
5 -	Síntese dos dados de validação.....	107
6 -	Resultados obtidos pelo modelo matemático de Higuchi descrito por Kunou e colaboradores (1998).....	117
7 -	Resultados obtidos pelo modelo matemático de Higuchi descrito por Korsmeyer - Peppas e colaboradores (2008).....	117
8 -	Parâmetros farmacocinéticos da CsA no estudo <i>in vivo</i> : taxa de eliminação da CsA.....	124
9 -	Parâmetros farmacocinéticos da CsA no estudo <i>in vivo</i> : constante de eliminação e tempo de meia vida do fármaco.....	126

LISTA DE QUADROS

1 -	Doenças associadas à uveíte.....	43
2 -	Vantagens e desvantagens das formas e vias de disponibilização de fármacos para o tratamento de doenças oculares do segmento posterior.....	49
3 -	Formas farmacêuticas de veiculação de CsA.....	70
4 -	Formas farmacêuticas de veiculação de CsA em oftalmologia no segmento anterior.....	73
5 -	Formas farmacêuticas de veiculação de CsA em oftalmologia no segmento posterior.....	76
6 -	Modelos de liberação aplicados.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

AHFS – do inglês, American Society of Health System Pharmacist

APCs – Células apresentadoras de antígenos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARVO – do inglês, Association for Research in Vision and Ophthalmology

AP1 – Região promotora de genes responsável da produção de IL-2

BHA – Barreira hemato-aquosa

BHR – Barreira hematorretiniana

°C – Grau centígrado

CA – Califórnia

CD – Dextrina

CEDAFAR – Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico

CI – Ciclofilina

CC – Corpo ciliar

CCG – Camada de células ganglionares

CD.seg/m²- Candela por segundo por metro quadrado

CFE – Camada plexiforme externa

CFN – Camada das fibras nervosas

CGM – Células glias de Müller

Chol – Colesterol

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMP – Via do complexo de compatibilidade principal

CMV – Citomegalovírus

CNE – Camada nuclear externa

CNI – Camada nuclear interna

CPE – Camada plexiforme externa

CPI – Camada plexiforme interna

CsD – Ciclosporina D

CV – Coeficiente de variação

CsA – Ciclosporina A

CTL – linfócito T citotóxico
DA – Dalton
DAG – Diacilglicerol
DMRI – Degeneração macular relacionada à idade
DP – Desvio padrão
D-PLA- Copolímero do ácido lático e glicólico forma dextrógena
D,L- PLA – Copolímero do ácido lático e glicólico forma racêmica
dextrógira
DPPC – Dipalmitoilfosfaditilcolina
DPR – Desvio padrão relativo
EPR- Epitélio pigmentado da retina
ESI – Eletrospray
EUA – Estados Unidos
EUI – Uveíte induzida por endotoxinas
FDA – do inglês, Food Drug Administration
FGF – do inglês, Fibroblast Growth Factor
FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier
GCV – Ganciclovir
g/mol – Gramas por mol
GMPc – Nucleotídeo (3'-5'guanossina monofosfato) cíclico
HIV – do inglês, Human immunodeficiency virus
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose
Hz – Hertz
IFN γ – Interferon gama
IL – Interleucina
IP₃ – Trifosfato de inositol
KDa – Kilo dalton
Kg - Quilograma
KV – Kilo volts
LIO – Lente intraocular
L-PLA- Copolímero do ácido lático e glicólico forma levógena
LQI – Limite de quantificação inferior
mg - Miligrama

μg – Micrograma
MHC – Complexo de histocompatibilidade
 μm – Micrograma
 m^2 – Metro quadrado
mm – Milímetro
min - Minuto
mL – Mililitro
 μL - Microlitro
EM – Espectroscopia de massa
ms – Milisegundo
mV – Milivolts
NFAT – Fator de transcrição de células T
ng- Nanograma
OP – Células horizontais
P.I – Padrão Interno
PDE – Fosfodiesteres
PEG – Polietilenoglicol
PKC – Inibidores de proteína quinase C
 $\text{PLC}_{\gamma 1}$ – Fosfolipase C
PGA- Copolímero do ácido glicólico
PLGA – Copolímero do ácido lático e glicólico
PLGA 50:50- Copolímero do ácido lático e glicólico, 50% ácido lático e 50% ácido glicólico
PLGA 75:25- Copolímero do ácido do ácido lático e glicólico, 75% ácido lático e 25% ácido glicólico
PLA – Copolímero do ácido lático
PVA – Álcool polivinílico
PVR – Vítreoretinopatia proliferativa
% p/p – Porcentagem peso por peso
POE – b – PCL – Copolímero derivado do metoxietileno e ϵ -caprolactona
RBR E/I – Barreira hematorretiniana externa/interna
RPM – Rotação por minuto
SE – Segmento exterior

SI – Segmento interior

SP – Segmento posterior

SLC – Sistema de liberação controlada

SLM - Sistema de liberação modificada

SLP - Sistema de liberação prolongada

SLS - Sistema de liberação sustentada

T CD8+ - Linfócito T citotóxico

T CD4+ - Linfócito T auxiliar

Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1

Th2 – Linfócito T auxiliar tipo 1

t- Pa – Ativador do plasminogênio tecidual

TGI – Sistema trato gastro intestinal

V- Volts

TCR – Receptor de células T

TGF $-\beta$ – do inglês, Beta Transforming *growth factor* fator

TMX – Tamoxifeno

TNF – do inglês, Tumoral Necrosis Factor

USP – do inglês, United States Pharmacopeia, Farmacopeia dos Estados Unidos

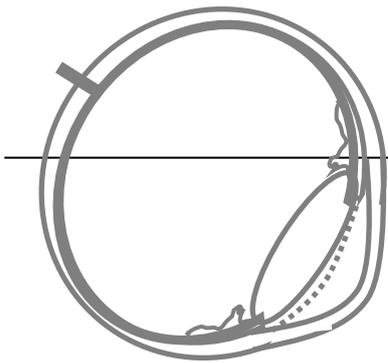
5 – Furd – fluorouridina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	O olho: características anatômicas e celulares.....	25
2.1.1	Anatomia geral do olho.....	25
2.1.2	Túnicas oculares.....	26
2.1.3	As estruturas acessórias.....	28
2.1.4	O segmento anterior.....	29
2.1.4.1	O humor aquoso.....	29
2.1.4.2	A lente e a córnea.....	30
2.1.4.3	A barreira hemato-aquosa.....	30
2.1.5	Segmento posterior.....	31
2.1.5.1	O humor vítreo.....	31
2.1.5.2	A retina.....	32
2.1.5.3	A barreira hematorretiniana.....	38
2.1.6	Tecidos oculares como fatores limitantes para a administração de fármacos.....	39
2.2	A uveíte.....	41
2.2.1	Aspectos gerais da doença.....	41
2.2.2	Regulação da resposta inflamatória aguda e imune.....	44
2.3	O tratamento da uveíte posterior.....	45
2.3.1	As vias de administração de fármacos no segmento posterior.....	45
2.4	Os sistemas de liberação modificada (SLM).....	50
2.4.1	Polímeros biocompatíveis como constituintes de SLM: o copolímero do ácido láctico e glicólico.....	51
2.4.2	Sistemas de liberação de fármacos (SLF) na oftalmologia.....	54
2.4.3	Implantes poliméricos na oftalmologia.....	55
2.4.3.1	Implantes poliméricos biodegradáveis.....	56
2.5	Tratamento farmacológico da uveíte.....	61
2.5.1	Classe de fármacos.....	61
2.5.2	Imunossupressores.....	62
2.5.2.1	Generalidades sobre os imunossupressores.....	62
2.5.2.2	A Ciclosporina A (CsA).....	62
2.5.2.3	Características físico-químicas da CsA.....	63
2.5.2.4	Efeito anti-inflamatório da CsA.....	65
2.6	Utilização clínica da CsA na oftalmologia.....	68
2.6.1	Sistemas de liberação de fármacos contendo CsA.....	70
3	OBJETIVOS	79
3.1	Objetivo geral.....	79
3.2	Objetivos específicos.....	79

4	MATERIAIS E MÉTODOS	81
4.1	Materiais.....	81
4.2	Animais.....	81
4.3	Métodos.....	82
4.3.1	Validação do método de análise da CsA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência aclopada à Espectroscopia de Massa (CLAE/EM).....	82
4.3.1.1	Preparo das soluções.....	82
4.3.1.2	Preparo das amostras do vítreo para a validação: método de precipitação de proteínas.....	82
4.3.1.3	Preparo das amostras do vítreo para a validação da eficiência do método de precipitação de proteínas: estudos de recuperação do analito e do efeito de matriz.....	83
4.3.1.4	Método analítico.....	83
4.3.1.5	Validação.....	84
4.3.1.6	Recebimento e armazenamento das amostras.....	84
4.3.2	Preparo dos implantes intraoculares.....	85
4.3.3	Inserção dos implantes na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos.....	85
4.3.4	Obtenção do vítreo.....	86
4.3.5	Determinação da quantidade de CsA liberada no vítreo a partir da matriz polimérica.....	87
4.3.6	Determinação da CsA nos implantes.....	87
4.3.7	Determinação da CsA presente no vítreo.....	87
4.3.8	Proposta dos mecanismos de liberação da CsA nos estudos <i>in vivo</i>	88
4.3.9	Avaliação da degradação da matriz polimérica.....	90
4.4	Avaliação da farmacocinética <i>in vivo</i>	91
4.4.1	Determinação da taxa de eliminação da CsA do vítreo.....	91
4.4.2	Determinação do tempo de meia vida da CsA no vítreo.....	91
4.5	Avaliação da segurança da utilização do implante <i>in vivo</i>	93
4.5.1	Observação clínica.....	93
4.5.2	Exame de biomicroscopia.....	93
4.5.3	Estudo histopatológico.....	93
4.5.4	Estudo eletrofisiológico.....	94
4.6	Análise estatística.....	95
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
5.1	Validação do método de análise da CsA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência aclopada à Espectroscopia de Massa (CLAE/EM).....	98

5.1.1	O espectro de massa: fragmentação das moléculas de CsA e TMX.....	98
5.1.2	Determinação da eficiência do método de precipitação de proteínas: a recuperação do analito e efeito da matriz.....	101
5.1.3	Validação da metodologia de CLAE utilizada para separação dos constituintes do analito: avaliação da seletividade e especificidade.....	102
5.1.4	Determinação da linearidade, exatidão, limite de quantificação inferior e sinal/ ruído.....	104
5.2	Determinação do mecanismo de liberação da CsA no estudo <i>in vivo</i>	110
5.2.1	Avaliação do perfil de liberação da CsA no vítreo a partir dos implantes poliméricos em estudo <i>in vivo</i>	111
5.2.2	Avaliação do perfil de degradação da matriz polimérica.....	112
5.2.3	Avaliação da cinética liberação da CsA <i>in vivo</i>	113
5.3	Determinação do período de permanência da CsA no vítreo: estudo da farmacocinética <i>in vivo</i>	120
5.4	Avaliação da segurança da utilização do implante intraocular em olhos de coelhos.....	128
5.4.1	Estudos pré-clínicos: exame biomicroscópico.....	128
5.4.2	Avaliação do efeito tóxico da CsA na estrutura da retina: estudo histopatológico.....	129
5.4.3	Avaliação do efeito tóxico da CsA na função retiniana por ERG.....	130
6	CONCLUSÃO	136
7	CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA	138
	REFERÊNCIAS	140
	ANEXOS	154



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A disponibilização prolongada de doses efetivas de fármacos na cavidade ocular é um grande desafio quando o objetivo é tratar a uveíte uma das principais causas de cegueira que acomete a população mundial (Myles et al., 2005; Jaffe et al., 2006; Behar-Cohen, 2002; Silva et al., 2010).

As formas farmacêuticas convencionais de aplicação tópica e sistêmica falham ao disponibilizar fármacos no segmento posterior do olho devido à dificuldade das moléculas do fármaco em atravessar os tecidos oculares e as barreiras hemato-oculares. Administrações repetidas geralmente em concentrações elevadas são necessárias na tentativa de manter, em níveis terapêuticos, o fármaco na cavidade vítrea (Myles et al., 2005; Amo; Urtti, 2008; Velez; Whitcup, 2009).

Outro fator de dificuldade está relacionado à utilização de fármacos que causam efeitos adversos no organismo, que muitas vezes levam o paciente a abandonar a terapia prescrita. Dentre os fármacos indicados para o tratamento da uveíte resistente à terapia com corticoides, destaca-se a *Ciclosporina A* (CsA), agente imunossupressor que inibe a manifestação inflamatória desencadeada pela doença (Gilger et al., 2000; Rezzani, 2004; Donnenfeld et al., 2009).

A administração direta na cavidade vítrea da CsA por meio de injeções intraoculares é uma excelente opção, porém não se trata de uma alternativa segura. Complicações como descolamento da retina, catarata, hemorragia e endoftalmite são frequentes. Além disso, uma única injeção não é suficiente para tratar a doença, pois o fármaco é rapidamente eliminado o que requer administrações repetidas (Pras et al., 2004; Yasukawa et al., 2001; Jaffe et al., 1998; Baeyens et al., 2006; Amo; Urtti, 2008; Bochot et al., 2011).

Uma das formas de veiculação da CsA no tratamento de uveíte posterior consiste em sua disponibilização direta no interior do olho, por meio de implantes intraoculares preparados com materiais biocompatíveis e biodegradáveis. Essa forma de administração proporciona a liberação gradual do fármaco e em doses efetivas (Yasukawa et al., 2005; Fialho; Cunha, 2006; Lee et al., 2010).

Os polímeros biodegradáveis têm sido largamente utilizados na área médica, como biomateriais, e farmacêutica, como matéria prima para confecção de sistemas

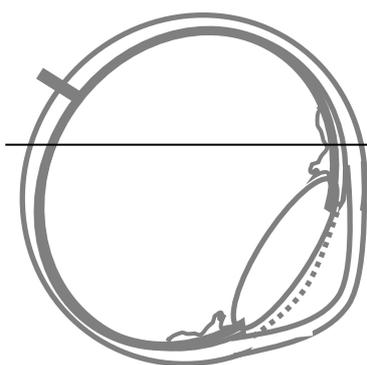
de liberação de fármacos. Dentre eles, destacam-se derivados do ácido lático e glicólico (PLGA) por apresentar satisfatória biocompatibilidade e efeito tóxico *in vivo* reduzido (Jain et al., 2000; Yasukawa et al., 2001; Bourges et al., 2007).

Implantes poliméricos oculares já vêm sendo utilizados na prática clínica oftálmica como o Vitrasert® e o Retisert® (Bausch & Lomb, EUA) que disponibilizam respectivamente o ganciclovir e a fluocinolona. O Sudorex® (Allergan, Inc, Irvine, CA), em fase III de estudo clínico, que disponibiliza a dexametasona é o outro exemplo de implante em avaliação (Bourges et al., 2006; Jaffe et al., 2006; Amo; Urtti, 2008; Choonara et al., 2009; Lee et al., 2010).

Alguns implantes poliméricos e biodegradáveis contendo CsA são descritos na literatura, esses capazes de liberar o fármaco em alguns meses e reverter o quadro da uveíte posterior em modelos animais. Porém, é ainda desconhecida a capacidade desses sistemas em tratar por completo a manifestação (Pearson et al., 1996; Jaffe et al., 1998; Jaffe et al., 2000; He et al., 2006; Dong et al., 2006).

Dessa forma, é de grande interesse atual a obtenção de novos implantes poliméricos biodegradáveis de fácil obtenção que veicule a CsA durante meses a anos em doses seguras, sem danos à estrutura ocular e suficiente para tratar a uveíte posterior.

Previamente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um implante a partir do PLGA capaz de disponibilizar a CsA na sua forma ativa na cavidade vítrea por um período prolongado. Frente à promissora aplicabilidade desse sistema, a tese desenvolvida objetivou avaliar a viabilidade, a farmacocinética e a toxicidade ocular em olhos de coelhos saudáveis. O período de permanência da CsA no vítreo foi determinado pela avaliação do mecanismo de liberação do fármaco e pela determinação do seu perfil farmacocinético a partir da matriz polimérica do sistema. Já a toxicidade foi estudada ao avaliar a estrutura, organização e função da retina.



Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O olho: características anatômicas e celulares

2.1.1 Anatomia geral do olho

O olho é o órgão responsável pela captação da luz refletida pelos objetos à sua volta. Ele se compõe do “bulbo do olho” e das “estruturas acessórias”, as quais são responsáveis pela sua proteção e movimentação. Ele pesa aproximadamente sete gramas, com um diâmetro médio entre 24 e 25 mm e encontra-se inserido na cavidade óssea onde apenas um sexto da superfície aparece na superfície (Dyce et al., 1997; Kowalczyk, 2010).

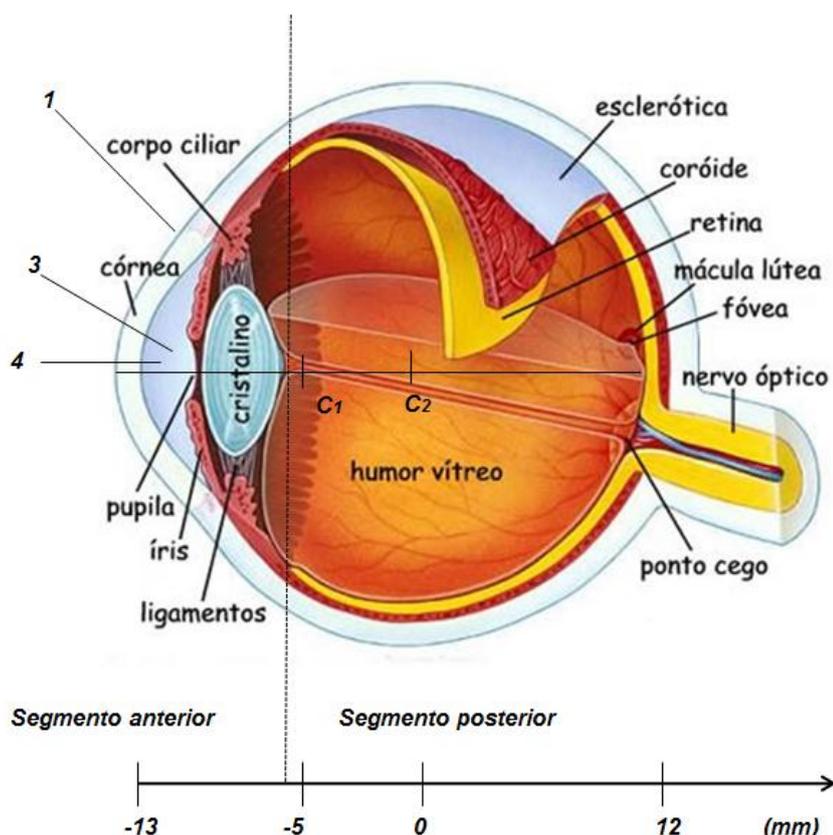


FIGURA 1 - Corte sagital de um olho humano. No esquema ilustrativo são indicados: 1) limbo esclero corneano, 2) câmara posterior, 3) câmara anterior e 4) humor aquoso.

Fonte: Adaptação de Rony (2008).

O bulbo do olho consiste em duas esferas: uma de diâmetro de 16 mm (Figura 1, C₁) que corresponde ao segmento anterior e outra de 20 mm (Figura 1, C₂) que corresponde ao segmento posterior. A luz atinge em primeiro lugar a córnea e atravessa o orifício da pupila. Em seu caminho, ela passa através do humor aquoso, atingindo imediatamente a lente que funciona como um sistema de focalização, convergindo os raios luminosos para um ponto focal sobre a retina. Na retina, as células fotossensíveis transformam a luz em impulsos eletroquímicos, os quais são enviados ao cérebro pelo nervo óptico. No cérebro, mais precisamente no córtex visual, ocorre o processamento das imagens recebidas, completando, então, sensação visual (Kowalczyk, 2010).

Este órgão é mantido na órbita, uma cavidade óssea que o separa da cavidade craniana, e que apresenta como principal função protegê-lo. A movimentação do bulbo do olho é realizada pelos músculos oculares, esses também responsáveis em mantê-lo suspenso na órbita (Dyce et al., 1997).

2.1.2 Túnicas oculares

O bulbo do olho é composto por três túnicas delgadas, denominadas de túnica fibrosa externa, túnica vascular média e túnica nervosa (Figura 1).

A túnica fibrosa externa é formada pela esclera e pela córnea, estruturas que conferem forma e firmeza ao olho. A esclera constitui a parte posterior opaca da túnica fibrosa e envolve externamente o bulbo do olho onde estão inseridos os músculos oculares. Ela é uma membrana rígida constituída essencialmente de fibras de colágeno e fibroblastos que confere a forma e rigidez do bulbo do olho. A esclera e também denominada como “branco do olho”, uma vez que confere a coloração branca ao olho e nesta estão inseridos os músculos oculares. Cerca de um quarto da túnica fibrosa é constituída pela córnea, um tipo especial de tecido conjuntivo denso que se encontra disposto e na forma lamelar. A sua transparência é inerente à sua estrutura tecidual e ao bombeamento contínuo de líquidos intersticiais. Não possui vasos sanguíneos e os nutrientes difundem para o tecido a partir dos vasos do limbo, pelo tecido lacrimal ou pelo humor aquoso, sendo o oxigênio absorvido diretamente da atmosfera (Dyce et al., 1997).

O limbo é uma região de um milímetro de comprimento, ricamente innervado e vascularizado que separa a córnea da esclera. Ele adere à conjuntiva, uma fina membrana que cobre a face interna da pálpebra, e a porção anterior da esclera. Nessa junção, se encontra o canal de Schlemm, pela qual passa o humor aquoso (Dyce et al., 1997). Transparente e não vascularizada, a córnea é considerada como a primeira lente óptica presente no bulbo do olho (Kowalczuk, 2010).

Conforme Dyce e colaboradores (1997), a túnica vascular média, também conhecida como úvea, é formada pela coróide, corpo ciliar e íris. Ela é dividida pela lente nas partes anterior, preenchida pelo humor aquoso, e posterior, preenchida pelo humor vítreo.

A coróide, tecido que reveste a esclera desde o nervo óptico até o limbo, é responsável pela nutrição da retina e pela coloração vermelha do fundo do olho, por ser uma estrutura intensamente vascularizada. O espessamento da coróide forma o corpo ciliar que, junto aos músculos ciliares, possibilitam a contração e extensão da íris. O corpo ciliar é constituído por fibras musculares lisas e inúmeros cílios orientados nesse tecido, por vasos sanguíneos. Esse é também responsável pela secreção do humor aquoso e controle dos músculos oculares cuja contração controla a forma da lente (Kowalczuk, 2010).

A íris é a terceira e menor parte da túnica vascular. Ela encontra-se suspensa entre a córnea e a lente, e apresenta um orifício central, a pupila, por onde a luz penetra até a parte posterior do olho. Ela divide o espaço entre a córnea nas câmaras anterior e posterior, ambas preenchidas pelo humor aquoso. A íris é a responsável pela coloração do olho que depende do número de células pigmentadas presente em seu estroma e no tipo de pigmentos das células (Dyce et al., 1997).

A túnica nervosa interna esta em contato com o humor vítreo e é a parte sensorial do bulbo do olho. Ela é formada pela retina pelo epitélio pigmentado da retina (EPR) e pela retina neurosensorial, tecido que contém as células fotossensíveis ou fotorreceptoras representadas pelos cones e bastonetes. Estas células transformam a energia luminosa em sinais nervosos, os quais são transmitidos para o cérebro pelo nervo óptico (Dyce et al., 1997).

2.1.3 As estruturas acessórias

As estruturas acessórias que protegem o olho incluem as pálpebras, o aparelho lacrimal, os cílios, as sobrancelhas e a conjuntiva (Figura 2). Os cílios e as sobrancelhas impedem o contato de partículas com a superfície do olho. A conjuntiva protege o olho por meio de mecanismos de defesa celulares e a lágrima, produzida pelo aparelho lacrimal, é distribuída na superfície pelas pálpebras retirando aquelas partículas que tiveram contato com a superfície ocular (Dyce et al., 1997).

A cada vinte segundos, o líquido lacrimal é instilado sobre a superfície da córnea formando uma tricamada espessa de 6 μm constituída pelas camadas externa lipídica, intermediária aquosa e interna de mucina. Seu volume é de 8 μL e é renovada na razão de 15% por segundo (Offret et al., 2003).

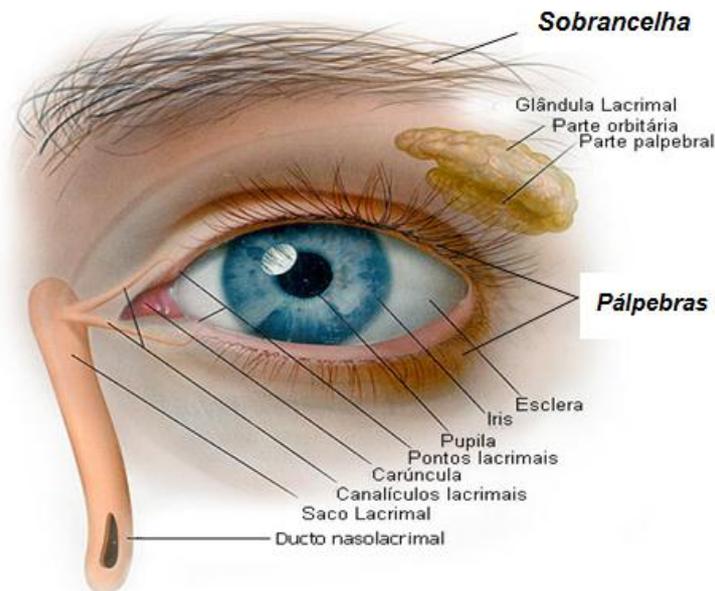


FIGURA 2 - Visão externa do olho.
Fonte: Adaptação de Janot (2006).

2.1.4 O segmento anterior

2.1.4.1 O humor aquoso

O humor aquoso, líquido aquoso e transparente, constantemente renovado, preenche a câmara anterior, formado pelo espaço entre a córnea e a lente (Figura 3). Ele é secretado pelos constituintes do corpo ciliar na câmara posterior, migra para a câmara anterior ao passar pela pupila e é drenado às veias venosas da circulação sistêmica via canal de Schlemm. Se a drenagem é comprometida, a pressão intraocular se eleva podendo acarretar sérias complicações (Lloyd et al., 2001).

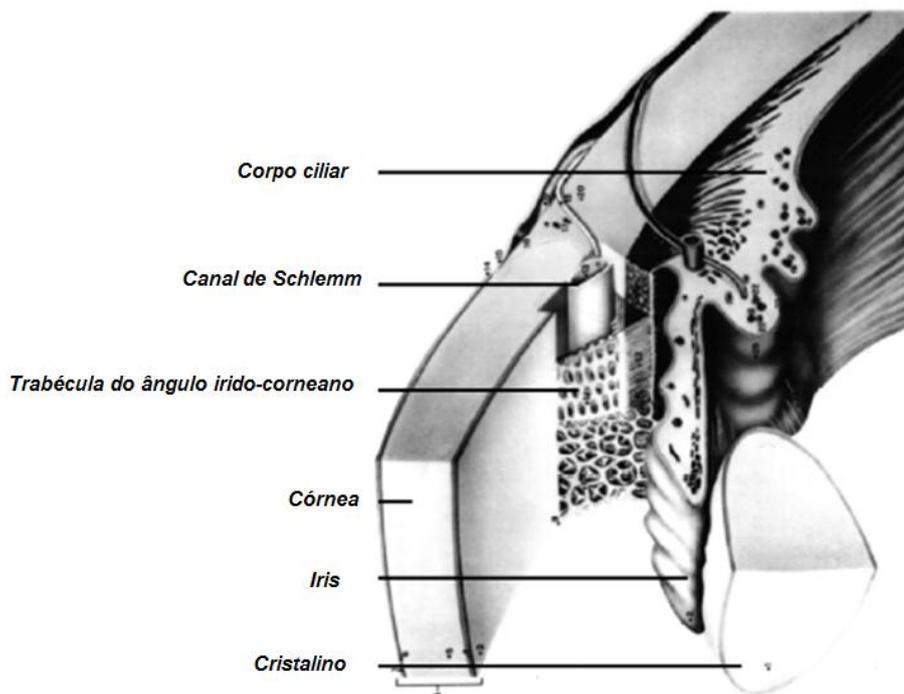


FIGURA 3 - Representação esquemática do ângulo irido-corneano. O ângulo irido-corneano é a zona de transição entre a córnea, esclera, íris e corpo ciliar responsável pela circulação do humor aquoso. A trabécula está situada no limbo, zona de transição da córnea transparente e esclera opaca. Sua distribuição é semelhante à aglomerados de orifícios circulares.

Fonte: Adaptação de Kowalczuk (2010, p.23).

Além de apresentar propriedades de refração e ser o responsável pela nutrição da córnea, o humor aquoso desempenha um papel importante, juntamente com o corpo vítreo, na manutenção da pressão intraocular no valor padrão de 15 mm Hg, com variação de ± 6 (Lloyd et al., 2001; Kowalczuk, 2010).

2.1.4.2 A lente e a córnea

A lente tem a forma biconvexa de diâmetro de aproximadamente 10 mm e um centro com espessura de 3-4 mm (Figura 3). Ela orienta a passagem da luz até a retina. A sua flexibilidade permite a visão de objetos próximos e distantes, propriedade denominada acomodação visual (Dyce et al., 1997). Esse efeito é atribuído à capacidade da deformação elástica da lente que sobre efeito da contração dos músculos ciliares, focaliza os raios luminosos e os direciona para *amacula lutea*. Com a idade, a perda da capacidade de acomodação origina a presbiopia que necessita da utilização de lentes corretivas convergentes para ocorrência da visão de perto (Lloyd et al., 2001; Kowalczuk, 2010).

A córnea é um tecido transparente e não vascularizado com diâmetro e espessura média de 12 mm e 250 µm, respectivamente (Hornof et al., 2005). Sua estrutura é altamente sensível a agressões físicas externas e pode ser danificada mesmo quando exposta a leves contatos. Ela é formada por cinco camadas: o epitélio, a membrana basal, a camada de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (Hornof et al., 2005; Kowalczuk, 2010). O seu epitélio é constituído de três camadas de células. As células superficiais são unidas pelas junções que limitam a passagem de moléculas hidrofílicas. As células intermediárias formam uma camada de células em alto grau de apoptose e as células basais são associadas a uma camada monoestratificada unidas pelas junções comunicantes. Como no epitélio cutâneo, as células basais são capazes de proliferar ao contrario das células superficiais que sofrem apoptose. O estroma é o tecido hidrofílico constituído por colágenos hidratados e o endotélio é o principal responsável na manutenção da transparência da córnea. Para controlar a hidratação, este tecido funciona como uma bomba de água assegurando o constante movimento de íons entre o estroma e o humor aquoso (Hornof et al., 2005; Kowalczuk, 2010).

2.1.4.3 A barreira hemato-aquosa

A barreira hemato-aquosa (BHA) está localizada na parte anterior do bulbo do olho e é formada pelas células endoteliais venosas da íris e pelo tecido não

pigmentado do corpo ciliar. Junções serradas estão presentes em ambas as camadas (Cunha-Vaz, 1997).

A íris é composta por um endotélio, uma membrana limitante anterior, um estroma, uma membrana limitante posterior. Fármacos dissolvidos no humor aquoso podem facilmente difundir pela sua superfície porosa, porém, moléculas de tamanho superior a 40 KDa não difundem pelos seus vasos e permeiam entre as fenestrações do capilares do corpo ciliar atingindo o humor aquoso (Hornof et al., 2005).

Já o corpo ciliar é uma estrutura bastante vascularizada de 6 cm² de superfície composto por cílios organizados. O epitélio não pigmentado do corpo ciliar é ligado por junções serradas ao epitélio pigmentado e contém células com inúmeras vesículas que garantem a difusão transcelular de moléculas de pequeno tamanho e lipofílicas. As moléculas são eliminadas pelas duas artérias ciliares longas posteriores e duas anteriores presentes (Lloyd et al., 2001).

2.1.5 Segmento posterior

2.1.5.1 O humor vítreo

O vítreo é uma massa gelatinosa transparente e fina constituída de água e fibras de colágeno (40 µg/mL), ácido hialurônico (120 µg/mL) e proteoglicanos. Seus filamentos proteicos são ordenados tridimensionalmente carregados por negativamente devido à presença do glicosaminoglicano. A sua viscosidade limita a difusão de moléculas funcionando como um reservatório. O seu volume total equivale a 4 mL o que representa 80% do volume ocular (Laude et al., 2010). A recepção dos raios luminosos pela retina é permitida devido à sua transparência (Laude et al., 2010; Sanharawi et al., 2010), conforme representado na Figura 4.

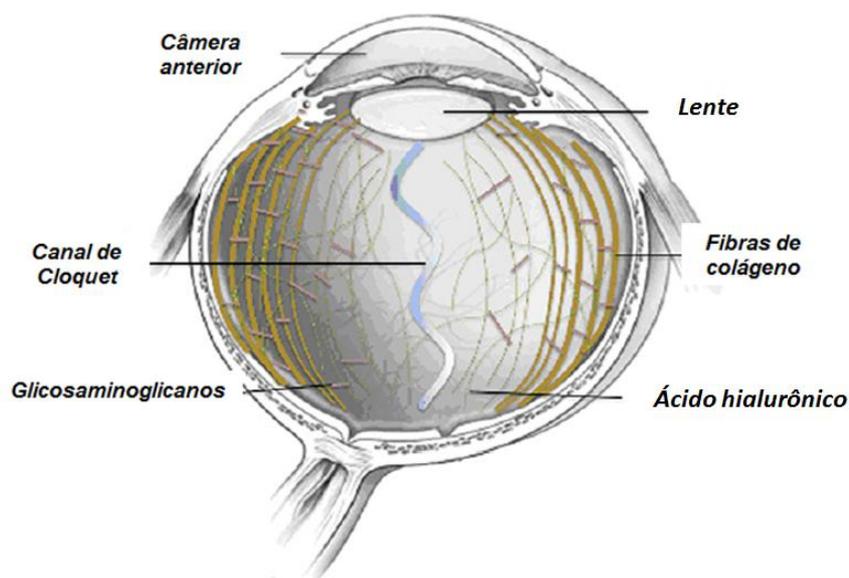


FIGURA 4 - Microestrutura do humor vítreo. O alinhamento do colágeno e aminoglicanos mantêm a rigidez e estabilidade do gel e controlam a difusão de moléculas.

Fonte: Adaptação de Laude et al. (2010, p.469).

Os constituintes do vítreo dificultam a difusão de moléculas carregadas negativamente. Os seus constituintes proteicos organizados em filamentos e extremamente negativos mobilizam algumas moléculas por meio de interações químicas ou físicas prejudicando a difusão destas moléculas pela cavidade vítrea (Myles et al., 2005).

2.1.5.2 A retina

A retina é composta pela retina neurosensorial e pelo epitélio pigmentado da retina (EPR), cuja estrutura e organização estão representadas na Figura 5.

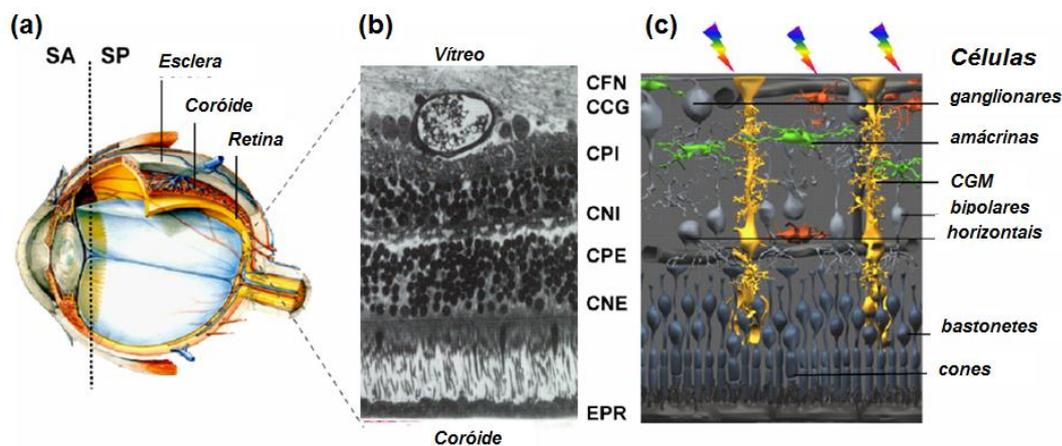


FIGURA 5 - Estrutura e organização da retina. (a) Esquema de uma seção sagital do olho humano. SA: segmento anterior; SP: segmento posterior. (b) Corte histológico da retina orientado de acordo com o trajeto da luz. (c) Esquema da retina.

Fonte: Imagens cedidas por F. Behar Cohen¹.

O epitélio pigmentado da retina (EPR) é o tecido mais externo da retina situado entre os fotorreceptores e os coriocapilares. Esse tecido é constituído de uma camada monoestratificada de células hexagonais repletas de melanócitos e a sua estrutura é atribuída à presença das junções serradas (*gap junctions*). As junções asseguram a fusão de duas membranas adjacentes que impede a passagem passiva de macromoléculas entre a coróide e EPR (Hornof et al., 2005; Behar-Cohen et al., 2009).

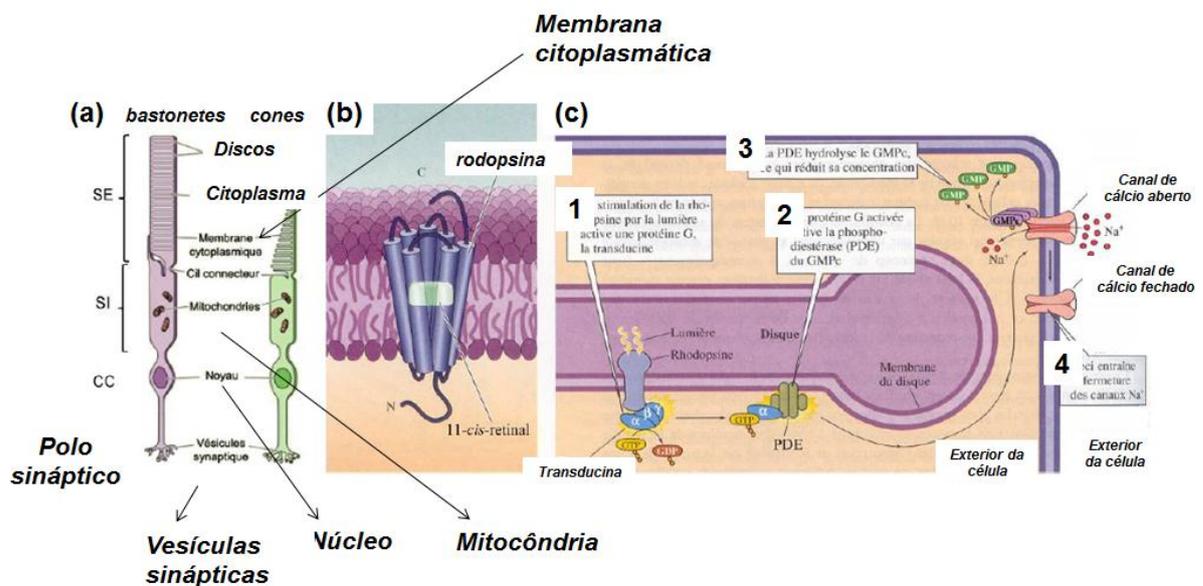
A camada nuclear externa (CNE) é exclusivamente composta pelos seus corpos celulares e a camada plexiforme externa (CPE) é o local de formação sináptico entre os fotorreceptores e as células bipolares. A camada nuclear interna (CNI) é composta pelos núcleos de três tipos de neurônios: as células horizontais, bipolares e amácrinas, e dos núcleos das células glias de Müller (CGM). A camada plexiforme interna (CPI) é o local de formação de conexões sinápticas entre o axônio das células bipolares e dos dendritos das células ganglionares. A camada das células ganglionares (CCG) contém o núcleo das células ganglionares. A camada das fibras nervosas (CFN) são as mais internas (Behar-Cohen et al., 2009).

A retina neuronal é constituída de 95% (92 milhões em número de células) de fotorreceptores, representados pelos bastonetes. Eles são responsáveis pela visão periférica, pela detecção de movimentos e pela visão noturna chamada, visão

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

escotópica, uma vez que apresenta alta sensibilidade ao contraste luminoso. Um único fóton é capaz de excitar um bastonete. Já os cones, cuja densidade celular de 4,6 milhões, estão situados em uma região próxima à *fóvea* e são as células responsáveis pela visão diurna de detalhes e cores, visão fotópica (Behar-Cohen et al., 2009).

Os fotorreceptores são células extremamente polarizadas constituídas de quatro partes: o segmento externo (SE), parte sensível que é formada por um empilhamento de 1000 discos; o segmento interno (SI) responsável pelo metabolismo; o corpo ciliar (CC) onde se situa o núcleo; a terminação sináptica que contém microfilamentos e uma rede sináptica envolvida por inúmeras vesículas. O polo sináptico é o responsável pela liberação do neurotransmissor glutamato (Figura 6a).



- 1: A estimulação da rodopsina pela luz ativa uma proteína G, a transducina.**
- 2: A proteína G ativada ativa a fosfodiesterase (PDE) do GMPc.**
- 3: A PDE hidrolisa a GMPc o que reduz a sua concentração.**
- 4: Este leva ao fechamento dos canais de Na⁺.**

FIGURA 6 - Morfologia dos receptores e diagrama da foto-transdução. (a) Esquema dos fotorreceptores. (b) Estrutura molecular da rodopsina. (c) Cascata dos segundos mensageiros na foto-transdução.

Fonte: Adaptação de Kowalczuk (2010, p.29).

Os bastonetes contêm um foto-pigmento cromóforo chamado rodopsina. Ela contém um cromóforo que absorve a luz, o 11 cis-retinal, um aldeído da vitamina A associado à proteína denominada opsina. Esta substância ajusta a absorção da luz em uma região do espectro. Quando o cis-retinal absorve um fóton, a sua molécula muda de conformação para 11 trans-retinal desencadeando uma série de alterações na rodopsina. O trans-retinal em excesso é armazenado no EPR na forma de lipofusina cuja quantidade se acumula com a idade. Tanto o acúmulo desse complexo como a ineficiência de algumas das enzimas envolvidas na via de conversão da cis-retinal pode desencadear a degeneração da retina (Figura 6b).

O estado de despolarização dos fotorreceptores depende da presença dos canais iônicos que regulam o fluxo de cálcio, potássio, sódio e magnésio situados na SE. A abertura desses canais é regulada pelo nucleotídeo (3'-5'guanosina monofosfato) cíclico (GMPc). No escuro, as altas concentrações de GMPc mantêm os canais iônicos abertos. O receptor é despolarizado com um potencial de membrana -40 mV. Na presença de luz, a transformação da rodopsina ativa um mensageiro intracelular, a transducina, que ativa um tipo de fosfodiesterase (PDE). A PDE diminui a concentração de GMPc por meio da sua hidrólise e leva o fechamento dos canais iônicos. Este acontecimento desencadeia uma despolarização da membrana SE e à diminuição da liberação de neurotransmissores pela sinapse presente nos fotorreceptores. O aumento progressivo da intensidade luminosa origina um potencial de membrana cada vez mais negativo até atingir o valor de - 65 mV (Figura 6c).

A principal função da retina é a transformação da luz em impulsos nervosos que acontece por meio do mecanismo chamado foto-transdução (Figura 6c). A camada nuclear externa (CNE) onde se encontram os fotorreceptores conduz o sinal elétrico até à camada plexiforme externa (CFE). A informação é então transmitida para as células bipolares, horizontais e amácrinas presentes na camada nuclear interna (CNI). As células horizontais e amácrinas são as responsáveis pela modulação da transmissão da informação que serão captadas pelos núcleos das células bipolares. Na camada plexiforme interna (CPI), as células bipolares formam sinapse com as células ganglionares cujos axônios se agrupam para formar o nervo ótico. O nervo ótico de cada olho se encontra no quiasma ótico até atingir o córtex

visual situado no tálamo, local onde se forma a memória para reconstruir a imagem do objeto observado (Kowalczyk, 2010).

Os sinais elétricos transmitidos pela retina podem ser detectados pela técnica de eletroretinograma (ERG), técnica largamente utilizada tanto na clínica como em laboratório de pesquisa para avaliar o funcionamento da retina (Dong.,Hare, 2000). Ela baseia no estímulo da retina por meio de sinais luminosos eventuais cujas respostas a esses estímulos são determinadas (Chen et al., 2006), Figura 7.

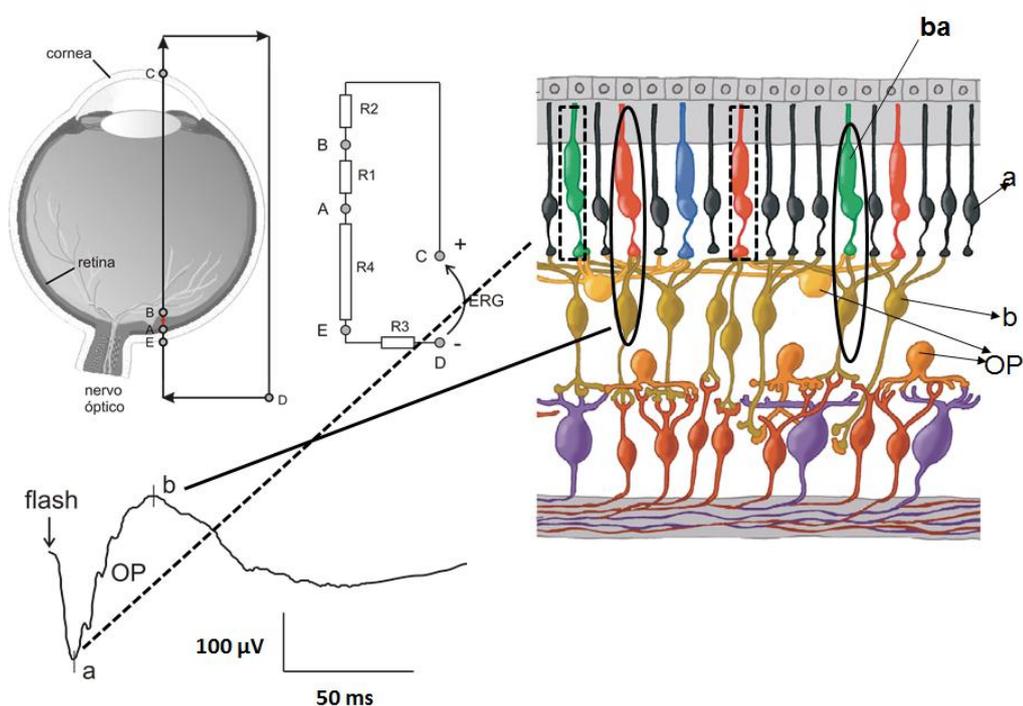


FIGURA 7 - Funcionamento simplificado da detecção dos sinais elétricos da neuroretina pelo eletroretinograma (ERG). (I) representação dos eletrodos conectados ao olho: (C), eletrodo positivo, catodo; (B, A, E, D) eletrodos negativos, anodo. (II) representação da transmissão do sinal elétrico e as resistências utilizadas para cada ponto A, B, C e E. (III) esquema ilustrativo da retina neuronal: (a) cones; (ba) bastonetes, (b) bipolares; (OP) células horizontais. (IV) sinais originados pelo ERG.

Fonte: Imagens cedidas por A. Messias e F. Almeida e Dr. Felipe de Almeida².

Resumidamente, um eletrodo positivo (catodo) é colocado na superfície da córnea e três eletrodos negativos (anodo) são colocados nas superfícies da retina, coróide e esclera.

O impulso elétrico flui por meio de resistências no sentido anodo e catodo e gera um sinal interpretado pelo detector. Resistências de menor

² Imagens cedidas pelo Prof. Dr. André Messias da Escola em aula ministrada na Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Ribeirão Preto, 22 jan. 2011.

comprimento são utilizadas para condução do sinal vindo de tecidos com menor capacidade de transmissão elétrica (córnea < retina < coroide < esclera). Quanto mais vascularizado o tecido, maior é a sua capacidade de transmitir o impulso elétrico. Para detecção do estímulo nervoso, um sinal de luz (iluminância) é fixado e emitido em direção à superfície ocular a cada 250 milésimos de segundos e estimula as células neuronais da retina. Para real detecção do sinal transmitido pelas células neuronais, é necessário adaptá-las ao escuro ou ao claro. Na adaptação ao escuro estas são providas de qualquer estímulo luminoso e os bastonetes se encontrarão em repouso³.

Inicialmente, os fotorreceptores estão despolarizados. Após o estímulo luminoso ($\text{CD}\cdot\text{seg}/\text{m}^2$), essas células se hiperpolarizam negativamente em um velocidade menor que 1 pico por segundo. Essas cargas dissipam pela superfície ocular tornando a córnea negativa, gerando uma diferença de potencial que proporciona a saída de potássio pela total abertura dos canais de sódio e potássio. Nesse momento, o sinal da onda A referente ao estímulo das células dos fotorreceptores é originado no eletroretinograma. Em seguida, os fotorreceptores transmitem os impulsos elétricos às células bipolares que despolariza positivamente por meio da saída de sódio neutralizando as cargas negativas residuais após os 250 segundos, finalizando o ciclo. O sinal referente à zona B, originada pelo estímulo emitido entre a sinapse elétrica entre fotorreceptores e células bipolares, é então detectada. O potencial oscilatório observado no eletroretinograma refere-se ao somatório do estímulo transmitido pelas células amácrinas e horizontais (comunicação entre fotorreceptores e células glanglionares estimuladas por diferentes cores)³.

A relação energia versus resposta é expressa em μV detectados em relação ao comprimento de onda da luz aplicada. Quanto maior a intensidade do feixe de luz menor é o tempo máximo necessário (ms) para a resposta. Um estímulo luminoso acima de $0,01 \text{ CD}\cdot\text{seg}/\text{m}^2$ é necessário para detecção da zona A. Ainda, quanto maior a intensidade, maior a resposta cone/bastonete³.

³ Aula ministrada por Prof. Dr. André Messias em seminário na Escola de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Ribeirão Preto, 22 jan. 2011.

2.1.5.3 A barreira hematorretiniana

Conforme Hornof e colaboradores (2005), a barreira hematorretiniana (BHR) é dividida em dois níveis: interna, situada entre os vasos retinianos e a retina, e externa, formada pelo EPR e os coriocapilares que se encontram na membrana de Bruch (Figura 8)

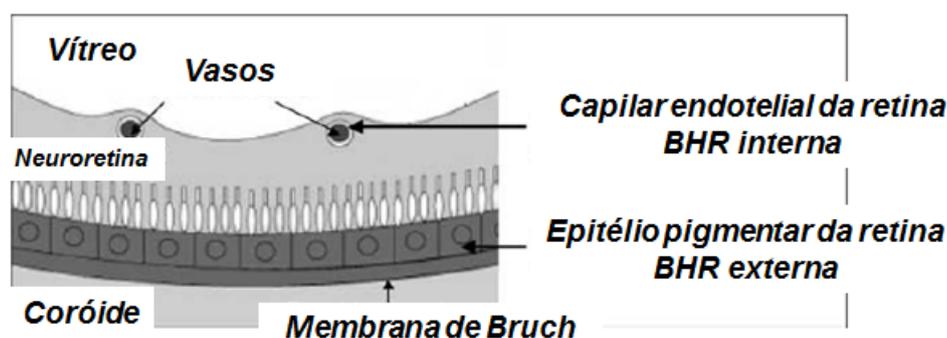


FIGURA 8 - Esquema representativo da barreira hematorretiniana (BHR) responsável pelo transporte de moléculas do vaso sanguíneo à neuroretina.
Fonte: Adaptação de Hornof et al. (2005, p. 211).

A camada mais interna formada pela retina é separada da coróide (C) pela membrana de Bruch. Ela apresenta pequenos capilares retinianos impermeáveis à passagem de moléculas superiores a 30 kDa e apenas permite uma difusão moderada no vítreo e retina de moléculas administradas pela via sistêmica. Já a membrana de Bruch é permeável a moléculas inferiores a 200 kDa. A associação das junções intercelulares presente entre a coróide e a retina que garante a permeabilidade seletiva dessa barreira (Hornof et al., 2005; Velez., Whitcup, 2009; Kowalczyk, 2010).

A função principal da barreira hematorretiniana é de regular a entrada de leucócitos, de nutrientes ou de outras moléculas provenientes da circulação sanguínea a fim de preservar a homeostasia da retina. Os mecanismos de transferência por essas barreiras são controladas por processos passivos por difusão aquosa da retina para o vítreo. Já a passagem de oxigênio e substâncias lipídicas da retina para os vasos retinianos acontece por transporte ativo. As moléculas terapêuticas podem também migrar para o vítreo a partir da câmara anterior e dos corpos ciliares por difusão passiva, porém esse processo é limitado pela barreira hemato-aquosa. A transferência de íons e proteínas na

região limite da retina / vítreo é igualmente assegurada pelas células presentes na barreira hematorretiniana por meio de processo ativo

A ruptura da BHR pode ocorrer durante uma ação cirúrgica ou em condições patológicas: infecções causadoras de lesões intraoculares, rejeição de transplante de córnea, inflamações (uveítes) ou neovascularizações intraoculares (DMRI, retinopatia diabética). Uma vez que a barreira BHR externa é rompida, células inflamatórias migram até a membrana de Bruch, infiltram no espaço sub-retiniano e provocam os efeitos secundários (Behar-Cohen et al., 2009).

2.1.6 Tecidos oculares como fatores limitantes para a administração de fármacos

As características anatômicas e fisiológicas do bulbo do olho são abordadas como fatores que limitam o tratamento tópico e sistêmico de doenças oculares. A eficiência de tratamento está relacionada com a capacidade da molécula do fármaco de penetração e de atravessar as barreiras hemato-oculares e permanecer em contato com os tecidos oculares em um tempo e dose necessários. A baixa penetração de fármacos é justificada pelas características teciduais da esclera, conjuntiva e córnea, pela existência da drenagem lacrimal, pela presença das barreiras hemato-aquosa e hemato-retinianas e pelas características físico-químicas implícitas ao fármaco (Hornof et al., 2005). As vias de absorção estão esquematizadas na Figura 9.

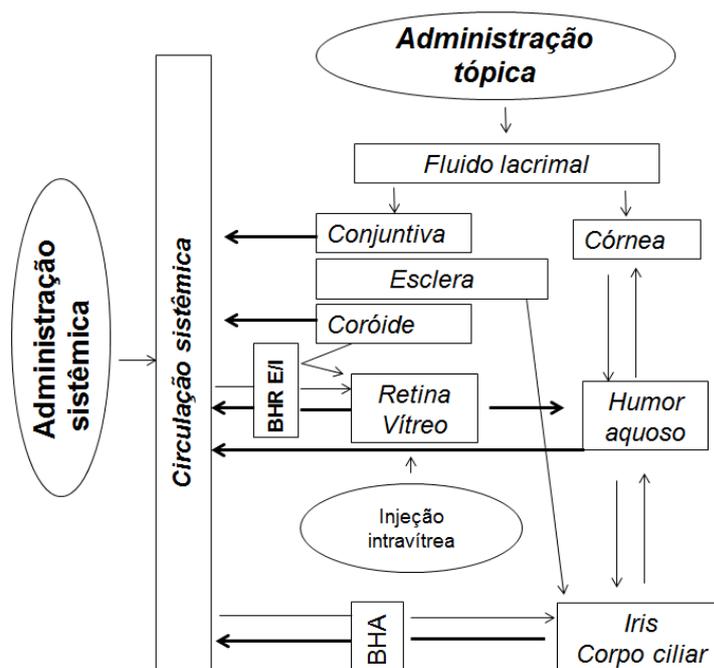


FIGURA 9 - Vias de absorção ocular. Rotas de penetração ocular de fármacos após administração tópica, sistêmica e intravítrea. As principais vias de eliminação estão indicadas pela seta escura. As barreiras oculares: BHR E/I, barreira hematorretiniana externa / interna; BHA, barreira hemato-aquosa.

Fonte: Adaptação de Hornof et al. (2005, p. 210).

Por via tópica, o primeiro obstáculo encontrado para penetração de fármaco é a drenagem lacrimal. Esse mecanismo permite que apenas 3% a 5% da dose sejam absorvidos pelos tecidos oculares, sendo o restante totalmente eliminado (Hughes et al., 2005; Amo., Urtti, 2008). Para os colírios, a camada lacrimal constitui tanto um meio de diluição como também diminui o contato do fármaco na superfície ocular a qual elimina o ativo instilado à superfície ocular a cada 30 segundos (Hornof et al., 2005; Diebold., Calonge, 2010).

A córnea é a principal barreira que impede a penetração de fármaco para a câmara anterior. A resistência à penetração intraocular de moléculas ocorre pela presença do epitélio que favoriza a travessia de moléculas lipofílicas não ionizadas (lipofílicas). Pela via paracelular, as barreiras epiteliais só permitem a passagem de substâncias hidrossolúveis de massa molecular inferiores à 500 Da e anfifílicas, ou seja, moléculas que contêm certa solubilidade tanto no meio hidrofílico como lipofílico. As células do endotélio impedem apenas a passagem de molécula de massa molecular acima de 70 KDa, devido à presença de junções serradas mais flexíveis àquelas presentes no epitélio (Hornof et al., 2005).

A conjuntiva apresenta junções intercelulares que são as principais responsáveis pela seletividade de absorção. Diferente das junções corneais, estas se apresentam maiores, permitindo a passagem de moléculas de maior massa molecular. A característica de seu tecido também permite a passagem de moléculas hidrofílicas, uma vez que é formado por uma membrana mucosa vascularizada e de área dezessete vezes maior quando comparado com o tecido corneal.

Além da baixa penetrabilidade de fármacos impostas pelos tecidos oculares, a constante renovação do humor vítreo e a própria existência de vasos sanguíneos limitam o tempo de permanência de fármacos na cavidade ocular. Estes são os principais responsáveis pela eliminação precoce dos fármacos, impossibilitando que seja atingida a dose terapêutica efetiva. Os fármacos são eliminados da câmara anterior pela reciclagem do humor aquoso e pela presença de circulação sanguínea na porção da úvea anterior. Já aqueles presentes no humor vítreo são eliminados pela câmara anterior, pela barreira hematorretiniana e pela própria circulação sanguínea (Järvinen et al., 1995).

2.2 A uveíte

2.2.1 Aspectos gerais da doença

A uveíte é uma doença decorrente da manifestação de processos inflamatórios na porção do trato uveal, o qual é composto pelo corpo ciliar, íris e coroide (Hesselink et al., 2004; Srivastava et al., 2010). Ela vem sendo mundialmente abordada como uma doença de grande impacto sócio-econômico, uma vez que acometem indivíduos de todas as faixas etárias e classes sociais (Jaffe et al., 2006). Na clínica médica, considera-se que são responsáveis por 3 a 15% de todas as causas de cegueira mundial (Hessenlink et al., 2004). Entre os indivíduos que apresentam a uveíte, pelo menos 35% dos casos sofrem sérias seqüelas da doença, que vão desde o comprometimento da visão até a cegueira plena (Jabs et al., 2000).

A uveíte é considerada uma doença de alta complexidade, que segundo Fialho (2003), pode ser desencadeada por fatores como a presença de agentes infecciosos, existência de debilidade do sistema de defesa do organismo, ocorrência de traumas cirúrgicos e acidentais ou até mesmo por motivos não determinados, as denominadas idiopáticas. Segundo Bennet e Cecil (1997), a uveíte pode ainda ser classificada segundo a etiologia (endógena quando desenvolvida por agentes do próprio organismo e exógena quando provocada por agentes infecciosos externos), segundo o curso clínico (aguda que manifesta durante meses e crônica que manifesta por alguns anos) e segundo o aspecto clínico (granulomatosa ou não granulomatosa).

A uveíte também pode ser dividida em anterior, intermediária, posterior e difusa, classificação anatômica esquematizada na Figura 10.

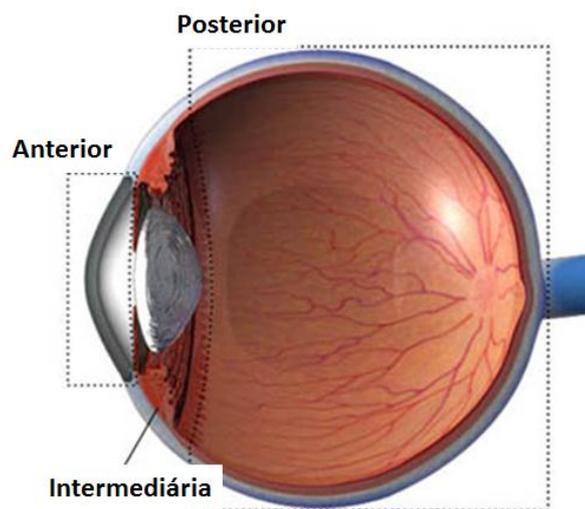


FIGURA 10 - Classificação anatômica da uveíte. A uveíte anterior compromete a íris e corpo ciliar. A uveíte intermediária trata-se da inflamação da porção posterior do corpo ciliar e da retina periférica. A ocorrência da uveíte posterior é limitada a processos inflamatórios que comprometem a coróide, retina e humor vítreo. Raramente ocorre a manifestação da uveíte difusa, esta que se manifesta em todo o bulbo ocular.

Fonte: Adaptação de Prevent Blindness America (2010).

A uveíte anterior, também denominada irite ou iriociclite, atinge os tecidos anteriores do bulbo do olho e compromete a íris e o corpo ciliar. A sua forma de manifestação aguda é caracterizada pela congestão do olho seguida de um halo vermelho, de sensação dolorosa, fotofobia, diminuição da visão e lacrimejamento. A congestão está relacionada ao depósito de células na córnea. Na inflamação mais grave, surgem precipitados ceratolíticos e

agregados celulares no dorso da córnea. Quando crônica, a inflamação é denominada irite granulomatosa e está associada algumas vezes às doenças sistêmicas (Bennet; Cecil, 1997; Kanski et al., 1994; Bodaghi et al., 2003).

A uveíte intermediária compromete a região posterior do corpo ciliar e a retina periférica e é caracterizada pela infiltração de células originadas do corpo vítreo, quando inflamado. A uveíte posterior atinge a retina, coróide e corpo vítreo, também chamada de retinites, coroidites e vasculites (Kanski, 1994; Bennet; Cecil, 1997). Geralmente apresentam exsudação na porção do corpo vítreo, podendo, pela turvação do humor vítreo, ocasionar a baixa acuidade visual (Bodaghi et al., 2003).

No caso da uveíte posterior, a inflamação presente desencadeia a formação de novos vasos sanguíneos e a migração de células. Desta forma, o meio ocular transparente se torna opaco, prejudicando a passagem da luz e a acuidade visual do indivíduo (Boyd et al., 2001; Kanski, 1994). Alguns indivíduos também podem apresentar a uveíte de forma difusa, também denominada panuveíte, uma vez que esta compromete o bulbo do olho como um todo (Fialho, 2003., Bodaghi et al., 2003).

Quanto às causas, a uveíte pode ser desencadeada por agentes virais, parasitários, bacterianos e por mecanismos intrínsecos ao organismo, sendo alguns deles exemplificados no Quadro 1.

QUADRO 1
Doenças associadas à uveíte

	Infeciosas	Outras
Anterior (iridociclite)	Herpes zoster Herpes simplex Doença de Hansen Toxoplasmose	Espondilite anquilosante Artrite reumatoide Síndrome de Reiter Sarcoide
Posterior (corioretinite)	Toxocaríose Histoplasmose Sarampo Sífilis Coccidioidomicose Oncocercose Brucelose	Síndrome de Behçet Síndrome de Vogt-Koyanagi – Harada Doença inflamatória intestinal Sarcoide Síndrome de Behçet Síndrome de Vogt-Koyanagi – Harada Doença inflamatória intestinal

Fonte: Bennet; Cecil (1997, p. 2404).

2.2.2 Regulação da resposta inflamatória aguda e autoimune

Considerando a alta vascularização do trato uveal e sua função de fornecer aos tecidos oculares nutrientes e células de defesa, torna-se explicável a possibilidade da existência de manifestações inflamatórias no local. Baseando-se no princípio de que a inflamação é desencadeada pela ativação de células linfocitárias por partículas estranhas, tanto endógenas (distúrbios autoimunes) como exógenas (vírus ou bactérias), acredita-se que as uveítes são originadas pelo mesmo processo. Segundo Pras e colaboradores (2004), o principal responsável pela ativação da resposta inflamatória são os linfócitos auxiliares (linfócitos T), células ativadoras de todo o sistema imune celular, junto com a apresentação de antígenos via complexo de compatibilidade principal (CMP) (Boyd et al., 2001).

Partículas estranhas ao organismo são apresentadas aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígeno na forma de fragmentos peptídicos via complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC I) para agentes endógenos e classe II (MHC II), como descrito na Figura 11.

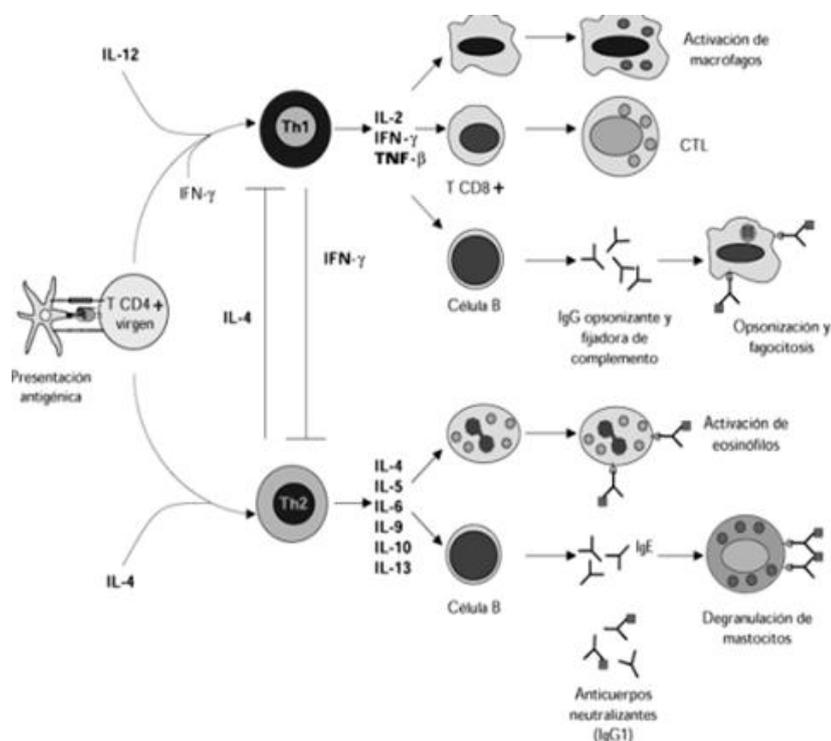


FIGURA 11 - Esquema das funções efetoras e dos linfócitos auxiliares diferenciados.
Fonte: Adaptação de Abbas et al. (1996, p.276).

O complexo formado entre MHC e TCR (ligante das células T) desencadeia sinais que irão produzir e liberar citocinas que, em conjunto, irão ativar toda a resposta imune protetora do organismo, tanto celular quanto pela atuação de anticorpos específicos (resposta humoral, via ativação de linfócito B). A apresentação de antígenos APCs por meio da expressão de MCH I ativa um tipo de linfócito T, chamado de citotóxico (Linfócito T CD8+; CTL) levando à apoptose celular, exposição das partículas estranhas fagocitadas e continuidade do ciclo. A expressão de MHC II os linfócitos T chamados de auxiliares (Linfócito T CD4+) que podem se diferenciar em Th1 e Th2 e liberar diversas citocinas ativadoras na resposta inflamatória. Os linfócitos Th2 liberam as citocinas IL-2, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (IFN γ) que ativam os macrófagos. Os linfócitos Th1 ativam as células B e os eosinófilos pela liberação das interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-11 (Figura 11). As citocinas inflamatórias TNF, IFN γ , IL-6 e IL-8 são aquelas encontradas no humor aquoso de pacientes que apresentavam a uveíte (Sakaguchi et al., 1998; Bertelmann; Pleyer, 2004; Dick et al., 2004).

2.3 O tratamento da uveíte posterior

2.3.1 As vias de administração de fármacos no segmento posterior

Na oftalmologia, a administração de fármacos pode ser feita por diferentes vias de administração (Figura 12).

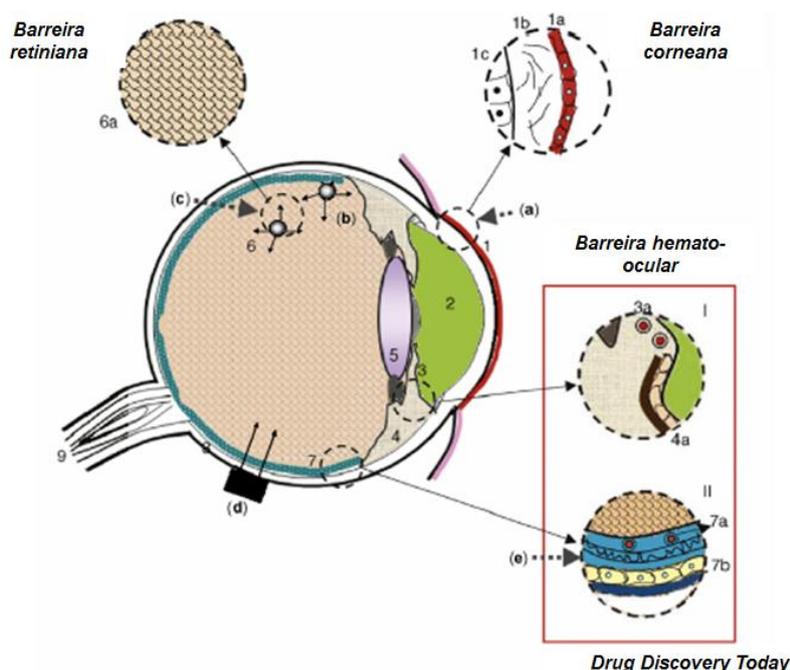


Figura 12 - Barreiras oculares e as vias de administração. No esquema são indicados: córnea: 1a, epitélio; 1b, estroma; 1c, endotélio; 2, humor aquoso; 3, íris; 4, corpo ciliar; 5, cristalino; 6, vítreo; 7, retina; 8, coroide, 9, nervo óptico. (a) administração tópica, (b) injeção intravítrea, (c) injeção transescleral e (d) injeção subretiniana.

Fonte: Adaptação de Naik et al. (2009, p.6).

A administração tópica é a via mais comum para tratamento de doenças oculares tais como o glaucoma, inflamação do segmento anterior ou da superfície ocular e de doenças externas do olho. Entretanto, essa via falha ao disponibilizar fármacos no segmento posterior, sendo assim ineficaz para o tratamento de doenças intravítreas (Amo., Urtti, 2008., Velez., Whitcup, 2009). Por essa via, apenas moléculas de pequeno tamanho podem difundir para a câmara anterior através dos vasos da íris (Figura 12, 3a), porém elas são rapidamente eliminadas pelo fluxo contínuo do humor aquoso.

A administração sistêmica também é pouco eficaz em disponibilizar fármacos no interior do bulbo do olho. Para atingir o segmento posterior, as moléculas administradas pela via sistêmica intravenosa (Figura 12, b) devem atravessar a barreira hematorretiniana (II) interna (Figura 12, 7a, endotélio dos vasos retinianos) e externa (Figura 12, 7b, EPR) da retina. Além disso, a eficiente circulação sanguínea presente nos tecidos oculares posteriores promove a redução da meia-vida dos fármacos no local, diminuindo suas concentrações a níveis inferiores ao terapêutico. Esta via de administração apresenta baixa resposta terapêutica, elevadas doses de fármacos são

necessárias e diversos efeitos colaterais são desencadeados (Amo., Urtti, 2008).

As injeções intravítreas e transesclerais (Figura 12, c e d) aumentam a biodisponibilidade de princípios ativos no segmento posterior e maximizam as suas concentrações na retina na região da mácula. Entretanto, as moléculas, ao se depararem com a barreira vítrea, são rapidamente distribuídas (Figura, 12, 6a). O aspecto tridimensional das fibras de colágeno constituídas pelos filamentos proteoglicanos e hialurônico dificultam a mobilidade de moléculas de grande massa molecular e carregadas positivamente (Naik et al., 2009; Laude et al., 2010).

A injeção direta, precisa e delicada, no espaço subretiniano (Figura 12, e) permite maior tempo de contato entre o agente terapêutico e as camadas externas da retina, sendo a melhor indicação para tratamento de doenças que acometem os tecidos da coroide e retina, como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI). Essa técnica é mais invasiva e pode danificar a integridade do EPR e dos fotorreceptores. Além disso, a terapia é restrita já que a difusão da molécula é limitada ao sítio de injeção.

Para a administração de fármacos no segmento posterior, a injeção intravítrea constitui a melhor alternativa à aplicação tópica e sistêmica e transescleral. Trata-se da administração direta do fármaco ou do medicamento na parte interior do bulbo do olho disponibilizando quantidade adequada de fármaco no vítreo (Pras et al., 2004; Naik et al., 2009). A sua grande desvantagem está relacionada à necessidade de injeções repetidas para manter o nível terapêutico do fármaco (Yasukawa et al., 2001; Jaffe et al., 1998; Baeyens et al., 2006; Bochot et al., 2011), o que pode ocasionar endoftalmites, deslocamento da retina, catarata e perfuração do olho (Peyman; Ganiban, 1995; Amo., Urtti., 2008).

As vias de administração acima descritas muitas vezes não são suficientes para prolongar a ação dos fármacos e efetivar o tratamento das doenças que acometem o segmento posterior. Para tanto, a melhora da eficácia na disponibilização de ativos no local é observada quando sistemas particulados e lipídicos são veiculados diretamente no espaço subconjuntival, periocular (transescleral) ou na cavidade vítrea (intravítreo).

O Quadro 2 apresenta as vantagens e desvantagens das vias de administração utilizadas bem como as formas farmacêuticas existentes para a sua veiculação.

QUADRO 2

Vantagens e desvantagens das formas e vias de disponibilização de fármacos para o tratamento de doenças oculares do segmento posterior

Forma farmacêutica e via de administração	Vantagens	Desvantagens
Colírio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fácil aplicação. ▪ Método não invasivo ▪ Boa aceitabilidade do paciente. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixa biodisponibilidade. ▪ Ineficaz para tratamento de doenças do segmento posterior. ▪ Altas concentrações e frequentes instilações são necessárias. ▪ Baixa adesão ao tratamento. ▪
Administração sistêmica	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maior efetividade para tratamento de doenças do segmento posterior comparado à aplicação de colírios. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fármacos não atravessam a barreira hemato-ocular. ▪ Toxicidade sistêmica. ▪ Altas concentrações e frequentes instilações são necessárias.
Injeção intravítrea,	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Comparada à administração sistêmica promove melhor disponibilidade de fármacos e menor toxicidade sistêmica. ▪ Disponibilização do fármaco no local de ação. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necessidade de repetidas administrações devida à rápida eliminação do ativo. ▪ Causa dor, desconforto, aumento da pressão intraocular, chances de infecção, possibilidade de deslocamento da retina, endoftalmite, baixa aceitabilidade do paciente.
Implantes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alternativa às injeções intravítreas. ▪ Estabilização do fármaco. ▪ Períodos prolongados de liberação na cavidade vítrea. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Deslocamento da retina e hemorragia vítrea. ▪ Implantes não biodegradáveis: necessidade de remoção cirúrgica. ▪ Implante biodegradáveis: erosão final não controlada e possível ocorrência de "burst" repentino.
Micropartículas, nanopartículas e lipossomas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estabilização do ativo e aumento do tempo de meia vida . ▪ Menor possibilidade de burst final comparado ao implante devido ao volume pequeno administrado. ▪ Localização do fármaco na EPR. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Opacidade do vítreo. ▪ Riscos associados à injeção intravítrea, periorcular e sunconjuntival. ▪ Relação concentração/volume desfavorável.
Iontoforese*	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Método não invasivo. ▪ Aplicado concomitantemente com SLF. ▪ Menor risco de toxicidade. ▪ Promove boa penetração de fármacos nos segmentos anteriores e posteriores. ▪ Boa aceitabilidade pelo pacientes. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requer repetidas aplicações. ▪ Pode causar dor moderada, porém sem risco de infecções ou ulcerações. ▪ Possível abandono da terapia devido à repetidas aplicações. ▪ Risco de choque.

*Técnica para potencializar a penetração de fármacos por meio de uma corrente elétrica gerada na superfície ocular que altera transitoriamente a seletividade do epitélio da córnea e conjuntiva (Behar-Cohen, 2002; Myles et al., 2005).

Fonte: Amo; Urtti (2008, p.139).

A administração de implantes intraoculares é abordada na literatura como a melhor alternativa para veiculação de fármacos no segmento posterior, apresentando consideráveis vantagens frente à aplicação de outros sistemas. Este sistema é descrito detalhadamente no item 2.4.3.

2.4. Os sistemas de liberação modificada (SLM)

Define-se como sistema de liberação modificada (SLM) todo sistema que disponibiliza o medicamento de forma diferente do perfil de liberação convencional (Ansel et al., 2005). Dentre as diferentes condições de SLM, a liberação do fármaco pode ocorrer de forma prolongada, sustentada e controlada, ou apresentar dois ou três perfis simultaneamente. Na liberação controlada (SLC) o fármaco é liberado em taxas semelhantes em cada intervalo de tempo. Na liberação sustentada (SLS) o fármaco é liberado de forma que mantenha constante a taxa de liberação em um determinado intervalo de tempo e na liberação prolongada (SLP) por um período de tempo maior quando comparado com os sistemas convencionais (Aulton, 2005).

Atualmente, diferentes tipos de sistemas de liberação de fármacos são desenvolvidos para uso na oftalmologia objetivando a liberação prolongada do ativo a fim de minimizar frequentes intervenções (Behar-Cohen, 2002; Bourges et al., 2007; Amo., Urtti, 2008). O principal desafio é melhorar a eficiência dos tratamentos convencionais (tópico e sistêmico), promover um maior contato do fármaco com a superfície ocular, minimizar as frequentes injeções intraoculares e facilitar a administração intravítrea. Agindo como um reservatório, esses sistemas diminuem a toxicidade local do fármaco, melhoram a biodisponibilidade e prolongam o tempo de contato do ativo no tecido alvo (Ding, 1998; Kaur et al., 2004; Peyman; Ganiban, 1995; Amo., Urtti, 2008; Bochet et al., 2011).

2.4.1 Polímeros biocompatíveis como constituintes de SLM: o copolímero do ácido láctico e ácido glicólico

Alguns polímeros são classificados como biomateriais, termo que vem sendo utilizado para descrever aqueles materiais derivados de fontes biológicas ou aqueles usados em terapias no corpo humano. Biomateriais são largamente utilizados na medicina como material cirúrgico, próteses odontológicas, próteses ortopédicas, ou mesmo como forma de veiculação de fármacos em sistemas de liberação (Griffth, 2000). Na oftalmologia, os polímeros são empregados desde a década de sessenta. Como exemplo, se destaca a aplicação dos derivados do silicone como substitutos do humor vítreo em pacientes com vitreoretinopatia proliferativa (PVR) e os polietilenos como lentes intraoculares (LIO) na cirurgia da catarata (Colthrust et al., 2000; Bourges et al., 2007).

No campo de engenharia de tecidos, os biomateriais são empregados como auxiliares na regeneração de tecidos e órgãos. Griffth (2000) descreve como sendo possíveis adjuvantes capazes de estimular mecanismos naturais celulares relacionados com o crescimento, metabolismo, diferenciação e migração celular. A síntese dos polímeros pode ser realizada de forma que este contenha, em sua constituição, transmissores extracelulares como fatores de crescimento ou componentes da matriz extracelular como proteínas, poliglicanos e polissacarídeos, fibronectina, integrinas, entre outros.

Como na aplicação na engenharia de tecidos, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SLF) torna-se um campo inovador quando se trata de utilização de polímeros que permitem a liberação sustentada (dias, semanas, meses ou anos) e direcionada (a um tumor, um tecido local ou até mesmo a um local específico da circulação sanguínea). O interesse surgiu na década de 80 objetivando o direcionamento da terapia protéica como forma de substituição dos métodos que empregavam injeções protéicas locais. Griffth (2000) comenta a aplicabilidade futura destes sistemas para diversas terapias, colocação também reforçada por Pillai e Panchagnula (2001), ao considerarem os polímeros como materiais promissores para o desenvolvimento de diversos SLF.

Nos últimos anos, o interesse no estudo da utilização dos polímeros biodegradáveis como matriz de SLF cresceu frente aos não biodegradáveis. Os biodegradáveis se distinguem dos não biodegradáveis por sofrerem degradações imediatamente ou após o período de aplicação. Adicionalmente, ao contrario dos polímeros não biodegradáveis tais como derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e copolímeros dos óxidos de etileno e propileno, os biodegradáveis (poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, polioctoésteres, poliuretanos e poli(acrilamidas)) proporcionam maior adesão e aceitação do paciente já que são totalmente absorvidos pelo organismo e não necessitam de remoção cirúrgica após o tratamento (Yasukawa et al., 2001; Bourges et al., 2007). Dentre os diversos polímeros sintéticos e biodegradáveis, os derivados do ácido láctico e ácido glicólico vêm sendo estudados nas duas ultimas décadas como potenciais materiais para veiculação de fármacos (Jain et al., 2000).

Os copolímeros dos ácidos láctico e glicólico são poliésteres cuja principal característica é a ligação éster presente entre os meros (Figura 13). Segundo Merkli e colaboradores (1998) e Jain (2000), estes copolímeros apresentam cadeias lineares, saturadas e comportamento termoplástico, ou seja, são facilmente moldados quando exposto ao aquecimento. Eles possuem um centro assimétrico, apresentando pelo ácido láctico (PLA) em uma mistura racêmica (D,L-PLA) ou por uma das suas formas levógira (L-PLA) e dextrógira (D-PLA), ligados de forma alternada ao polímero ácido glicólico (PGA). Segundo os mesmos autores, o copolímero encontra-se no estado amorfo, quando é constituído apenas da forma racêmica D,L-PLA (Figura 13).

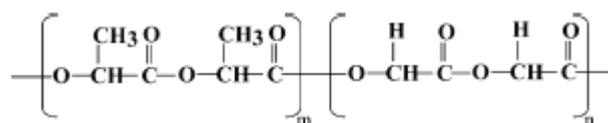


FIGURA 13 - Estrutura química do copolímero ácido poli (D,L-lático-co-glicólico). (m) e (n) representam inúmeros meros do ácido láctico e glicólico, respectivamente que definem a massa molecular do copolímero e as suas propriedades termoplásticas.

Fonte: Loo et al. (2004, p.260).

A biodegradação desses polímeros ocorre por meio da clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando o ácido lático e glicólico. Esses ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (Figura 14).

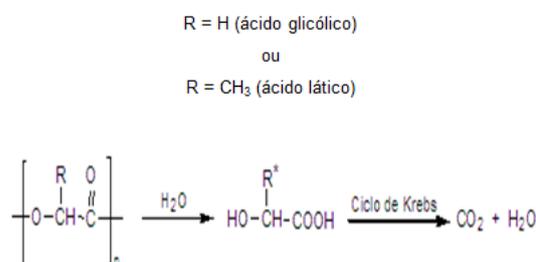


FIGURA 14 - Mecanismo de hidrólise do PLA, PGA ou PLGA. * Os produtos de degradação: ácido lático (caso o polímero seja PLA), ácido glicólico (polímero de origem PGA) e ambos (polímero de origem PLGA).

Fonte: Adaptação de Merkli et al. (1998, p. 569).

A hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade dos polímeros são determinadas pela proporção de ácidos láticos e glicólicos na sua constituição. O ácido lático possui maior hidrofobicidade devido à presença do grupo metila na sua estrutura e o PGA é bastante susceptível a hidrólises. Assim, quanto maior a proporção de ácido lático, maior será a hidrofobicidade do copolímero e menor será o tempo de degradação (Fialho et al., 2003).

O comportamento *in vitro* e *in vivo* dos diferentes copolímeros são influenciados pelas proporções de ácido lático e glicólico no material. A sua resistência mecânica, a sua capacidade de intumescimento e a taxa de degradação são influenciadas pela cristalinidade a qual depende da proporção molar presente no copolímero. O PLGA contendo a mesma razão de PLA e PGA (PLGA 50:50) são hidrolisados mais rápido do que o PLGA contendo 75% de PLA e 25% de PGA. Adicionalmente, o copolímero apresenta maior grau de cristalinidade e menor ponto de fusão quanto menor for a sua massa molecular. A mudança de conformação do estado vítreo para o amorfo acontece em temperaturas entre 36 °C e 50 °C, onde os menores valores são observados quando presente uma maior proporção de PLA (Lewis, 1990; Jain et al., 2000). Na forma amorfa, estes materiais são facilmente moldados, sendo possível a obtenção de sistemas de diferentes formas de tamanhos em temperaturas consideravelmente baixas e de fácil manuseio na prática laboratorial.

2.4.2 Sistemas de liberação de fármacos (SLF) na oftalmologia

Na Figura 15, alguns exemplos de sistemas de liberação de fármacos utilizados no segmento posterior estão classificados como sistemas de curta e prolongada ação.

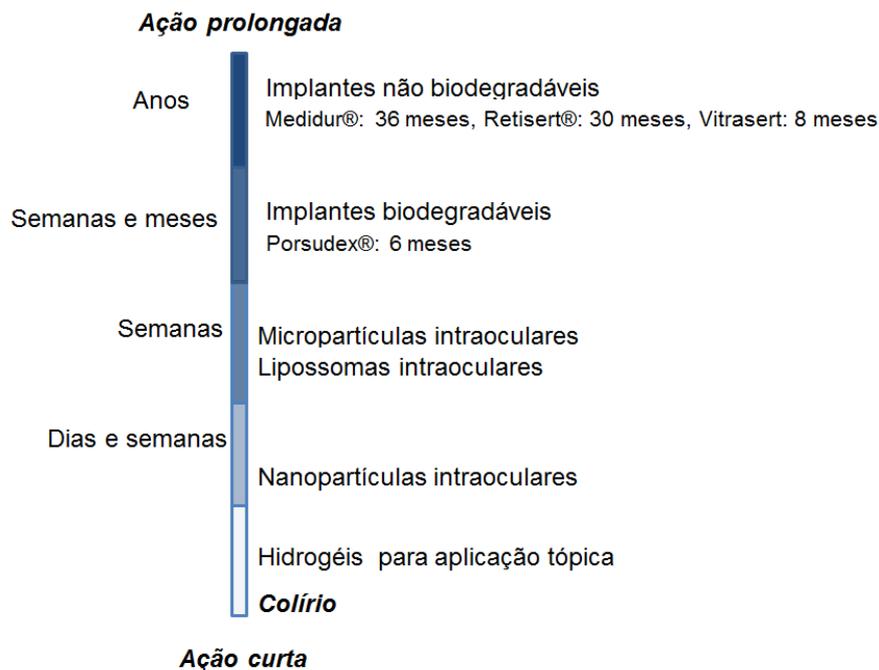


Figura 15 - Período de ação de diferentes sistemas de liberação de fármacos aplicados no tratamento de doenças oftálmicas do segmento posterior.

Fonte: Adaptação de Amo; Urtti (2008, p.137).

Segundo Amo e Urtti (2008), o período de liberação do fármaco a partir dos SLF é justificado pela composição, tamanho da matriz polimérica, pelo tipo de interação polímero/fármaco e pela característica intrínseca da molécula (solubilidade em água e coeficiente de partição polímero/água). Os implantes, por apresentarem uma matriz sólida e compacta, são capazes de liberar o fármaco durante meses ou anos. Moléculas que apresentam grande afinidade pela matriz serão liberadas mais lentamente. Ainda, por sofrerem erosão, as matrizes biodegradáveis disponibilizam o ativo mais rapidamente. Já os fármacos vinculados pelas partículas poliméricas e lipídicas são disponibilizados em uma maior velocidade (durante semanas e dias).

As nano ou microsistemas poliméricos, esferas e cápsulas, são capazes de melhorar a permeação epitelial. Eles são reservatórios constituídos de polímeros biodegradáveis: poliacrilcianocrilatos, poliacrilamidas,

polimetilmetacrilatos, poliésteres (PLA, PLGA), entres outros. Em meio aquoso, liberam a molécula do ativo por consequência do intumescimento e erosão da matriz. Ainda, o tamanho, a hidrofobicidade e carga são os responsáveis pela permanência destes sistemas na cavidade ocular (Behar – Cohen, 2002).

Já a aplicação tópica dos hidrogéis, constituídos de um material polimérico que adquire viscosidade na presença do meio aquoso, formação *in situ*, minimizam a difusão do ativo para o meio exterior e prolonga à sua liberação por horas ou até dias. Quanto menor o tamanho das partículas ou glóbulos, mais rápida é a disponibilização do ativo (Amo; Urtili, 2008).

2.4.3 Implantes poliméricos na oftalmologia

Historicamente, Michelson e colaboradores (1979), citados por Peyman e Ganiban (1995, p.114), desenvolveram o primeiro sistema de liberação sustentada para via ocular contendo o fármaco gentamicina, como sendo uma minibomba osmótica para implantação subconjuntival para o tratamento de endoftalmite. Este sistema foi implantado em ratos por meio de incisão do bulbo do olho. A liberação de 0,01 mg de fármaco por mL de corpo vítreo em um período de quatro dias e meio foi determinada nesse estudo. Posteriormente, outros implantes foram sendo desenvolvidos objetivando o tratamento de retinite causada por citomegalovírus (CMV), endoftalmite, vitreoretinopatia proliferativa, retinites virais e uveítes, apresentando resultados satisfatórios quanto ao perfil de liberação controlada de fármacos (Peyman; Ganiban, 1995; Colrhurst et al., 2000).

Implantes poliméricos não biodegradáveis já vêm sendo utilizados na prática clínica como o Vitrasert®, Retisert® (Bausch & Lomb, EUA) e o Ozurdex® ou Posurdex® (Allergan, Inc, Irvine, CA). O Vitrasert® é o primeiro dispositivo intraocular aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1996. Os polímeros derivados do álcool polivinílico controlam a liberação do ganciclovir no vítreo por oito meses. É efetivo no tratamento de retinites desencadeadas pelo citomegalovírus (CMV), uma infecção oportunista em pacientes portadores do vírus HIV, porém foram relatados casos de endoftalmite e deslocamento da retina (Choonara et al., 2009). O Retisert®,

um implante não biodegradável desenvolvido à base de álcool polivinílico e silicone, disponibiliza a acetona de triancinolona. Embora este dispositivo seja efetivo para o tratamento da uveíte não infecciosa posterior, também apresenta efeitos no tratamento da catarata. Jaffe e colaboradores (2006) avaliaram a eficácia e segurança do implante intraocular Retisert® para o tratamento de uveítes posteriores não infecciosas. Os efeitos indesejáveis como catarata e aumento da pressão intraocular observados apresentaram-se inferiores quando comparado com a administração sistêmica de formulação contendo o fármaco (Choonara et al., 2009; Lee et al., 2010). Já o Ozurdex® ou Posurdex®, aprovado pela FDA em 2009, é empregado para o tratamento do edema macular associado à oclusão de veias da retina. Ele apresenta-se na forma cilíndrica à base do PLGA e disponibiliza a dexametasona. Uma maior dose é liberada nos primeiros dois meses e menores doses são disponibilizadas nos seis meses restantes (Bourges et al., 2006; Amo., Urtti, 2008; Lee et al., 2010; Silva et al., 2010).

Adicionalmente, encontram-se descritos na literatura dois implantes em fase III de estudos clínicos. O Medidur® (Alimera Science, EUA e pSivida Inc, EUA) e o Sudorex® (Allergan, Inc, Irvine, CA). Medidur® é um implante não biodegradável desenvolvido contendo a fluocinolona para ser inserido na cavidade vítrea por meio de injeções intravítreas para o tratamento de edema macular. Ele apresenta pequeno tamanho e espessura (3 mm de comprimento e 0,37 mm de diâmetro) e é capaz de liberar o fármacos entre dezoito e trinta e seis meses (Bourges et al., 2006; Amo., Urtti, 2008; Lee et al., 2010). Já o Sudorex® é um implante biodegradável constituído de PLGA e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e dexametasona. Ele é capaz de liberar o fármaco por sete a dez dias. Em cirurgias de catarata, o implante é inserido na câmara anterior para controle de inflamação pós-operativa sem a necessidade de suturar o local de implantação (Lee et al., 2010; Silva et al., 2010).

2.4.3.1 Implantes poliméricos biodegradáveis

Capazes de disponibilizar moléculas de fármacos durante meses ou até anos, os implantes sólidos intravítreos biodegradáveis (do inglês, *inserts*) são

excelentes alternativas para tratamento de doenças intraoculares. O seu principal objetivo é possibilitar a disponibilização de doses efetivas do fármaco por um período prolongado diretamente na cavidade vítrea, superando os inconvenientes da presença da barreira hematorretiniana. Em uma única cirurgia, eles são inseridos na cavidade vítrea por meio de uma incisão posterior a lente e anterior à retina (*pars plana*). Embora esta seja uma técnica invasiva e relativamente arriscada, este sistema é ainda considerado a melhor alternativa para disponibilizar fármacos na cavidade vítrea já que não exige repetidas administrações (Amo., Urtti, 2008).

Os implantes poliméricos não desencadeiam respostas inflamatórias no local da aplicação uma vez que são constituídos de materiais poliméricos atóxicos, não cancerígenos, hipoalergênicos (Athanasiou et al., 1996). Os sistemas compostos por polímeros não biodegradáveis, precisam ser removidos posteriormente por processos cirúrgicos enquanto os biodegradáveis são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando a remoção, e proporcionando, desta forma, uma maior adesão e aceitação do paciente ao tratamento (Yasukawa et al., 2001).

Os polímeros biodegradáveis, por serem termoplásticos, são facilmente moldados e conseqüentemente implantados na câmara anterior, no espaço peribulbar e intraescleral ou na cavidade vítrea. Os implantes são originados por dois diferentes processos: 1) moldagem a quente de uma massa previamente liofilizada contendo o polímero e o fármaco e 2) evaporação de solvente, Figura 16.

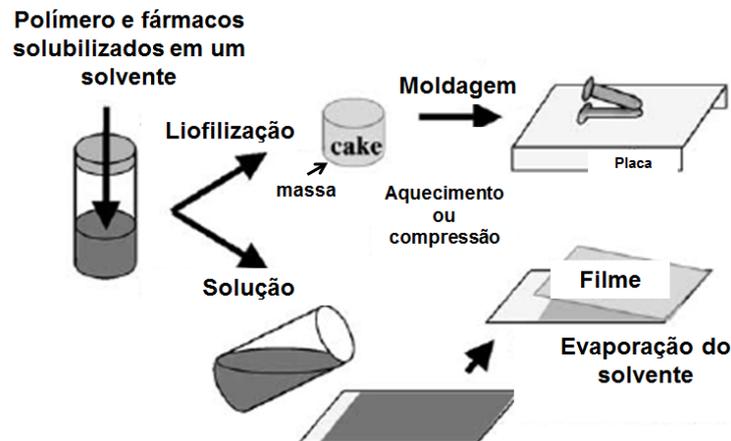


Figura 16 - Processos de obtenção do implante biodegradável em diferentes formas.
Fonte: Adaptação de Yasukawa et al. (2005, p. 2038).

Durante a moldagem a quente, a massa polimérica contendo ou não o fármaco é comprimida em um molde para obtenção da forma desejada. Para deformação do material, a temperatura atingida deve ser superior à temperatura de sua transição vítrea e não degradar a molécula do fármaco. Diferente da moldagem a quente, o filme polimérico é obtido pela simples evaporação do solvente da solução polimérica ou polimérica/fármaco sobre uma superfície não adesiva. A espessura do implante é determinada pelo recipiente em que esta se encontra (Yasukawa et al., 2005; Fialho; Cunha, 2006).

A liberação do fármaco a partir dos implantes intraoculares poliméricos biodegradáveis está relacionada com a característica do próprio sistema e acontece devido às diversas alterações que ocorrem nos materiais (Kunou et al., 1995). Em geral, os perfis de liberação de diversos fármacos a partir de implantes poliméricos segue uma cinética de zero ou primeira ordem e possuem três etapas de liberação (Kunou et al., 1995; Kunou et al., 2000; Yasukawa et al., 2005; Lee et al., 2010), Figura 17.

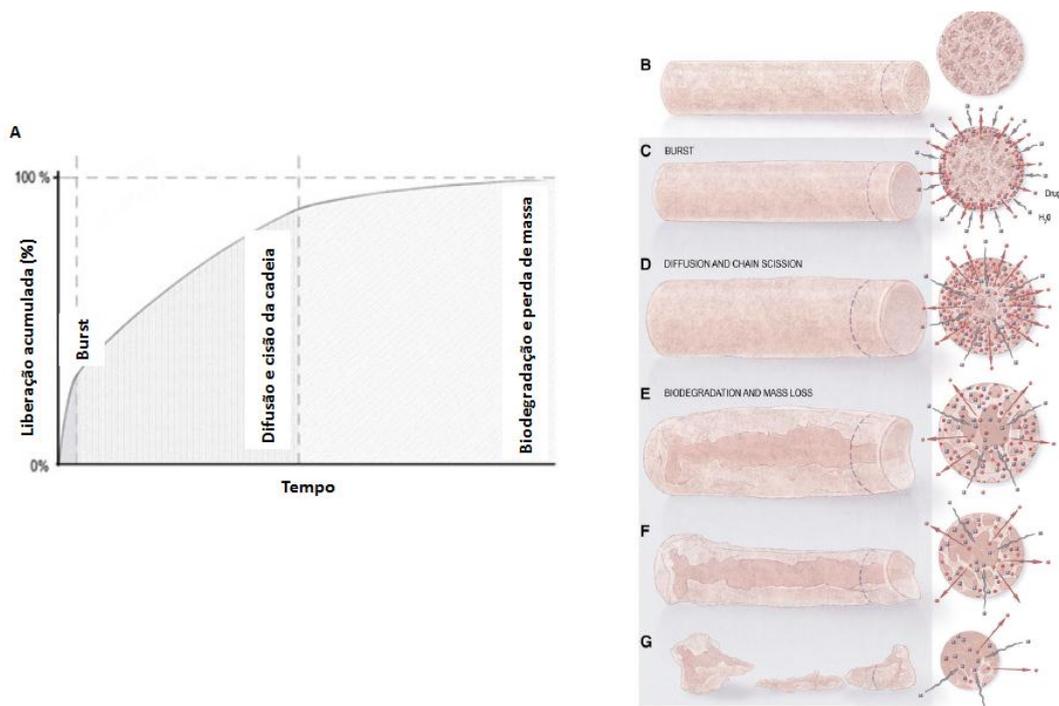


Figura 17 - Mecanismos de liberação de fármacos e biodegradação da matriz polimérica. (a) Gráfico ilustrativo da liberação acumulada versus tempo a partir do implante composto de PLGA. (b) implante polimérico antes da implantação mostrando uma matriz homogênea e porosa. (c) A ocorrência do burst inicial logo após a implantação, molécula do fármaco (vermelho) e penetração da água (azul). (d) fase de difusão do fármaco pela matriz intumescida e cisão da cadeia. (e) biodegradação e início da erosão da matriz. (f) Degradação da matriz e consequente alteração do formato do implante. (g) Fragmentação do implante e o fim da biodegradação.

Fonte: Adaptação de Lee et al. (2010, p. 2048).

A primeira etapa consiste de uma alta taxa de liberação do fármaco, conhecida como “burst” inicial, possivelmente devido à presença do fármaco na superfície do sistema (Yasukawa et al., 2005; Lee et al., 2010), Figura 17c. A segunda etapa acontece por difusão do fármaco da matriz porosa para o meio externo antes mesmo de ocorrer a erosão da matriz polimérica e está relacionada com o coeficiente de difusão, saturação do meio de incubação e à concentração de fármaco nos sistemas (Figura 17d). A terceira fase corresponde a um repentino “burst” devido ao intumescimento e desintegração da matriz propriamente dita (Kunou et al., 1995; Lee et al., 2010), Figura 17e a 17g.

A vantagem na utilização dos implantes intraoculares constituídos de matrizes poliméricas biodegradáveis é explorada por diferentes pesquisadores nos últimos quinze anos os quais focalizam a suas pesquisas no desenvolvimento de novos SLFs. Copolímeros derivados do ácido lático e ácido glicólico (PLGA) foram utilizados para o desenvolvimento de alguns

implantes intraoculares. Kunou e colaboradores (1995) avaliaram o perfil de liberação de implantes a partir do PLA e PLGA contendo diferentes concentrações de ganciclovir (GCV). Os autores observaram que o implante de PLA contendo 10% p/p de GCV apresentou um período de liberação, *in vitro*, de seis meses. O implante de PLGA contendo 25% p/p de GCV, testado por meio da administração em coelhos, apresentou um período de permanência no corpo vítreo de três meses e na retina e coroide de cinco meses. A concentração do fármaco encontrada na retina e coroide foi superior à encontrada no corpo vítreo.

Jaffe e colaboradores (1998) mostraram a eficácia da ciclosporina A (CsA) no tratamento de uveíte induzida em ratos quando administrada por meio de um sistema de liberação intraocular composto por álcool polivinílico (PVA). Os autores observaram que o implante presente na cavidade vítrea era capaz de inibir a manifestação da uveíte e a liberação do fármaco foi detectada por um período superior a nove anos.

A vantagem na utilização de implantes poliméricos não biodegradáveis frente às demais formas de tratamento da uveíte posterior foi observada, por exemplo, por Jaffe e colaboradores (2000) ao verificar uma melhora no quadro da doença em pacientes portadores ao administrar implante intraocular de PVA e silicone contendo fluocinolona.

Zhou e colaboradores (1998) desenvolveram um implante para o tratamento de vitreoretinopatia proliferativa (PVR), composto de PLGA 50:50. Esse implante apresenta três segmentos cilíndricos, cada um contendo os seguintes fármacos: 5-fluorouridina (5-Furd), triancinolona e um agente trombolítico, o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA). Com o objetivo de promover um período de latência para liberação do fármaco no momento adequado. Para reduzir o risco de sangramento pós-operatório, a porção do implante contendo o t-PA foi revestida com PLGA. Os resultados mostraram que o 5-Furd e o Triam foram liberados na taxa de 1,0 µg/dia por mais de quatro semanas e de 10,0-190,0 µg/dia por mais de duas semanas, respectivamente. Após um período de latência de cerca de dois dias, o t-PA foi liberado ativo na taxa de 0,2-0,5 µg/dia durante duas semanas.

Sakurai e colaboradores (2003) avaliaram a eficácia da administração de um implante biodegradável constituído de PLGA em diferentes proporções, contendo tacrolimus, para o tratamento de uveítes experimentais em ratos. O polímero na proporção de 50:50 e massa molar de 63000 dalton (Da) apresentou uma rápida liberação do fármaco. Os autores observaram que o implante, além de ser efetivo na supressão da uveíte e liberar o fármaco de forma contínua, apresentou uma liberação do fármaco na cavidade vítrea dependente do tamanho da cadeia polimérica e da massa molecular do polímero avaliado.

Okade e colaboradores (2003) demonstraram a lenta biodegradação do implante intra-escleral constituído de PLA e contendo fosfato de dexametasona. A concentração atingida no corpo vítreo, coróide e esclera foi capaz de suprimir respostas inflamatórias por mais de oito semanas. Os autores também observaram que a taxa de eliminação do fármaco no corpo vítreo foi maior que na esclera e coróide.

Fialho e Cunha (2006) desenvolveram um implante de PLGA capaz de liberar acetato de dexametasona por aproximadamente oito semanas quando implantados em olhos de coelhos. A dexametasona foi posteriormente veiculada com sucesso em um implante intraocular constituído de poli- ϵ -caprolactona (ϵ -PCL) cujo fármaco foi liberado em aproximadamente vinte e um dias (Fialho et al., 2008).

2.5 Tratamento farmacológico da uveíte

2.5.1 Classes de fármacos

O tratamento da uveíte está relacionado à utilização de medicamentos capazes de prevenir ou tratar complicações visuais, aliviar o desconforto dos pacientes e controlar a manifestação inflamatória (Kanski, 1994). Entre as diversas classes de fármacos, encontram-se descritos na literatura a utilização de midriáticos, antiinflamatórios corticóides, agentes citotóxicos, antivirais e imunossupressores (Kanski, 1994; Fialho, 2003). Estes fármacos podem ser administrados pelas vias oral (tratamento sistêmico), tópica e por meio de

injeções perioculares e intravítreas (Kanski, 1994; Jabs et al., 2000). A escolha do fármaco ocorre devido à frequência e à via de administração, da natureza, da gravidade e da localização da doença (Fialho, 2003).

A utilização tópica de midriáticos (atropina, tropicamida e ciclopentolato) visa proporcionar um maior conforto ao paciente, uma vez que minimizam espasmos do músculo ciliar potencializados pela manifestação da uveíte, principalmente pela uveíte anterior (Kanski, 1994).

O tratamento usual da grande parte das manifestações da uveíte apresenta como terapia de primeira escolha a administração sistêmica ou intravítreas de corticóides, sendo citados a dexametasona (Okade et al., 2003), prednisonola, prednisona (Jabs et al., 2000), triancinolona (Baeyens et al., 2006) e seus respectivos sais. Porém, quando o organismo não se adapta à terapia com corticóides, muitas vezes eles devem ser substituídos por outros medicamentos.

2.5.2 Imunossupressores

2.5.2.1 Generalidades sobre os imunossupressores

A substituição terapêutica baseia-se na administração de fármacos imunossupressores, capazes de inibir a resposta imune inflamatória (Hesselink et al., 2004). Entre os imunossupressores encontram-se os fármacos citotóxicos como o metrotexato, 6-mercaptopurina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucil e os fármacos que inibem as células T, como *Ciclosporina A* e tacrolimus e sirolimus (Jabs et al., 2000; Kulkarni, 2001). A *Ciclosporina A* (CsA), em substituição à terapia baseada em corticóides, torna-se uma alternativa para o tratamento da uveíte posterior.

2.5.2.2 A Ciclosporina A (CsA)

A *Ciclosporina A* (CsA) é um polipeptídeo isolado do fungo *Tolypocladium inflatum gams*, identificado, inicialmente, em 1976, por Borel e colaboradores (1976) (apud Rezzani, 2004, p. 88), como uma nova molécula

antibiótica com propriedades antifúngicas, antiparasitárias e antiinflamatórias. O primeiro trabalho sobre a utilização da CsA na clínica médica foi publicado, em 1978, por Calne e White (apud Graeb et al., 2004, p.125) que constataram a potente propriedade imunossupressiva ao observar diminuição de rejeições em pacientes com rins transplantados, sucesso terapêutico que despertou, durante os últimos vinte anos, o interesse de diversos pesquisadores pela CsA (Abendroth, 2004).

Desde então, a CsA apresenta grande impacto na medicina de transplantes, também sendo utilizada para o tratamento de doenças de origem infecciosas - ceratoconjuntivite por adenovírus, herpes, ceratite, imunológicas - ceratoconjuntivite atópica, conjuntivite, úlcera corneal reumatóide, doença do olho seco, lúpus eritematoso, psoríase, artrite reumática, entre outras, e manifestações pós-operatórias - ceratoplastia (Jabs et al.,2000; Rezzani,2004; Bertelmann., Pleyer, 2004; Hesselink et al.,2004).

2.5.2.3 Características físico-químicas da CsA

A *Ciclosporina A* é descrita como um polipeptídeo hidrofóbico constituído por 11 peptídeos arranjados em uma cadeia rígida composta por ligações peptídicas. É definida como ciclo-[MeBmt¹-Abu²-MeGli³-MeLeu⁴-Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹] (Figura 18).

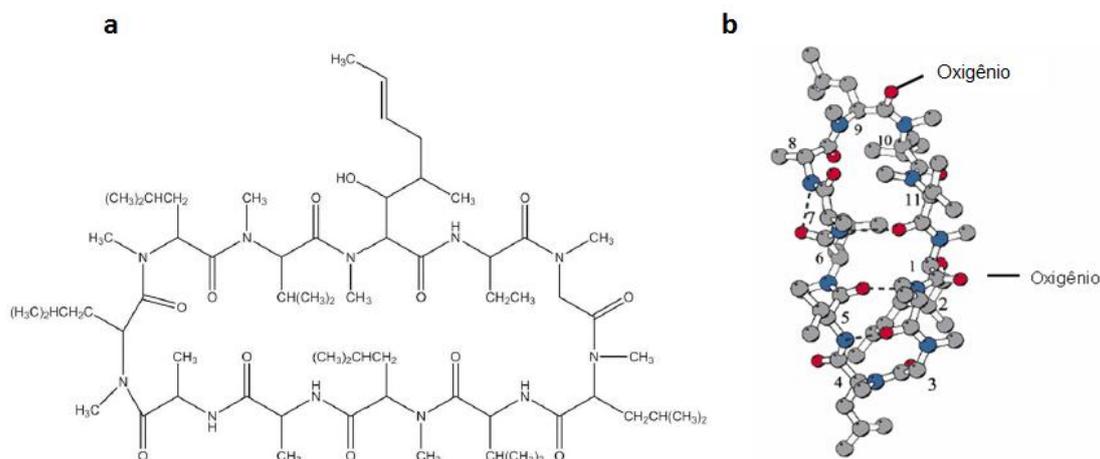


FIGURA 18 -Estrutura plana e tridimensional da CsA. (a) representação do esqueleto molecular. (b) representação da estrutura tridimensional da CsA.

Fonte: (a) Donnenfeld et al. (2009, p.322). (b) Adaptação de Jegorov et al. (2003, p.441).

Em consequência da rigidez da configuração estrutural (Figura 18), as cadeias de aminoácidos são direcionadas em ângulos para a direita em relação ao plano formando dois sítios hidrofóbicos, um contendo os peptídeos Abu², Val⁵, MeVal¹¹, projetados em um lado da cadeia, e os peptídeos MeBmt¹, MeLeu⁴, MeLeu⁶ e MeLeu¹⁰ para o lado oposto. As ligações intermoleculares beta-folhas envolvem tripeptídeos antiparalelos [Meval¹¹-MeBmt¹-Abu²] e [Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷]. MeGly³ e MeLeu⁴ participam em um tipo de torção beta e torções nas cadeias na forma de loop são formadas pelo pentapeptídeo [Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeLeu¹¹]. Contêm ligações cis de amidas entre os resíduos de aminoácidos adjacentes MeLeu⁹ e MeLeu¹⁰. A estrutura é mantida por quatro ligações de hidrogênio envolvendo os 4 grupos amida não metilado (amidas secundárias) dos resíduos 2, 5, 7 e 8. As ligações de hidrogênios definem a estrutura secundária sendo uma do tipo torção gama entre [N²-O⁵] e [N⁷-O¹¹], duas beta-folhas entre [N²-O⁵] e [N⁷-O¹¹] e uma não usual definida por torção gama entre [N⁸-O⁶] dos aminoácidos D-Ala⁸ e Me Leu⁶ em volta da Ala⁷ (Loor et al., 2002).

A existência de diversas estruturas tridimensionais define o esqueleto da molécula, sua estabilidade conformacional e consequentemente sua atividade como imunossupressora. Estudos extensivos da estrutura-atividade da CsA tem mostrado que a cadeia MeBmt em sua devida conformação é essencial, porem não suficiente, para a atividade biológica (Lazarova et al, 2003). A

dependência de outros sítios hidrófobos também é demonstrada no trabalho de Loor e colaboradores (2002) ao definir a importância conformacional dos sítios hidrofóbicos na capacidade de ligarem aos segundos mensageiros calcinerina e glicoproteína P.

Vale ressaltar que a estrutura não só determina estabilidade e atividade, mas também define o aspecto morfológico do fármaco. Este comportamento é explicado por Stevenson e colaboradores (2003) ao avaliar picos de FTIR característicos de estruturas secundárias e associar suas variações aos diferentes estados do material e a existência de polimorfismo da CsA, característica atribuída pelo autor, ao processo de obtenção e do meio de diluição.

2.5.2.4 Efeito anti-inflamatório da CsA

A disponibilização do fármaco no sítio ativo é dependente de suas propriedades farmacocinéticas e de distribuição. Segundo Rezzani (2004), o fármaco é absorvido no intestino, posteriormente se liga às lipoproteínas presentes no sangue, é metabolizado pelo fígado e finalmente eliminado pelas fezes. Abendroth (2004) constatou que apenas 30% do fármaco presente na formulação Neoral® administrado oralmente é biodisponibilizado e que, em poucos minutos, 60% a 70% do fármaco absorvido são distribuídos nas células sanguíneas. Destes, 34% se ligam a proteínas transportadoras e são eliminados em um tempo de meia vida de, aproximadamente, dezenove horas. A metabolização observada foi explicada como sendo dependente da regulação, expressão e interação do fármaco pelas enzimas do citocromo P450 e diretamente dependente da idade do paciente.

No momento em que o fármaco é disponibilizado na circulação sanguínea e distribuído em todos os compartimentos do organismo, observa-se que ele agirá indiretamente em outros mecanismos celulares, desencadeando efeitos adversos. Nos rins promove mudanças estruturais e funcionais das células do túbulo proximal e arteríola aferente, aumenta níveis de tromboxano A₂ e causa a vasoconstrição renal (Abendroth, 2004). Os efeitos refletem na hipertensão, como disfunção cardiovascular e nefrotoxicidade (aumento do

nível sérico de creatinina, retenção de fluido, edema, hiperclôremia, acidose metabólica e hipercalemia). Observam-se, também, efeitos no sistema nervoso central (tremor, confusão, rubor, efeitos dermatológicos como hirsutismo e gengival hiperplasia), hepatotoxicidade (hiperbilirrubinemia), efeitos no sistema trato gastrointestinal (TGI) (diarréia, náuseas, vômitos, anorexia, desconforto abdominal, gastrite, úlcera péptica ou hemorragia retal), complicações infecciosas (pneumonia, septicemia, abscessos), infecções sistêmicas por vírus e fungos, efeitos hematológicos (leucopenia, anemia e trombocitopenia) e possíveis reações anafiláticas (AHFS Drug Information, 2000, p. 3378- 3381). No bulbo do olho este fármaco pode ocasionar alteração na eficiência transitória das células neuronais da retina (Pearson et al., 1996; Jaffe et al., 1998; Gilger et al., 2000; He et al., 2006).

A ação desejada ocorrerá quando a molécula for capaz de regular as respostas imunes por meio da diminuição da liberação da IL-2 liberada pelos linfócitos T - células T (AHFS Drug Information, 2000; Jabs et al., 2000; Gilger et al., 2000; Rezzani; 2004; Donnenfeld et al., 2009). A Figura 19 descreve, esquematicamente, o mecanismo de ativação das células T e o mecanismo de ação da CsA.

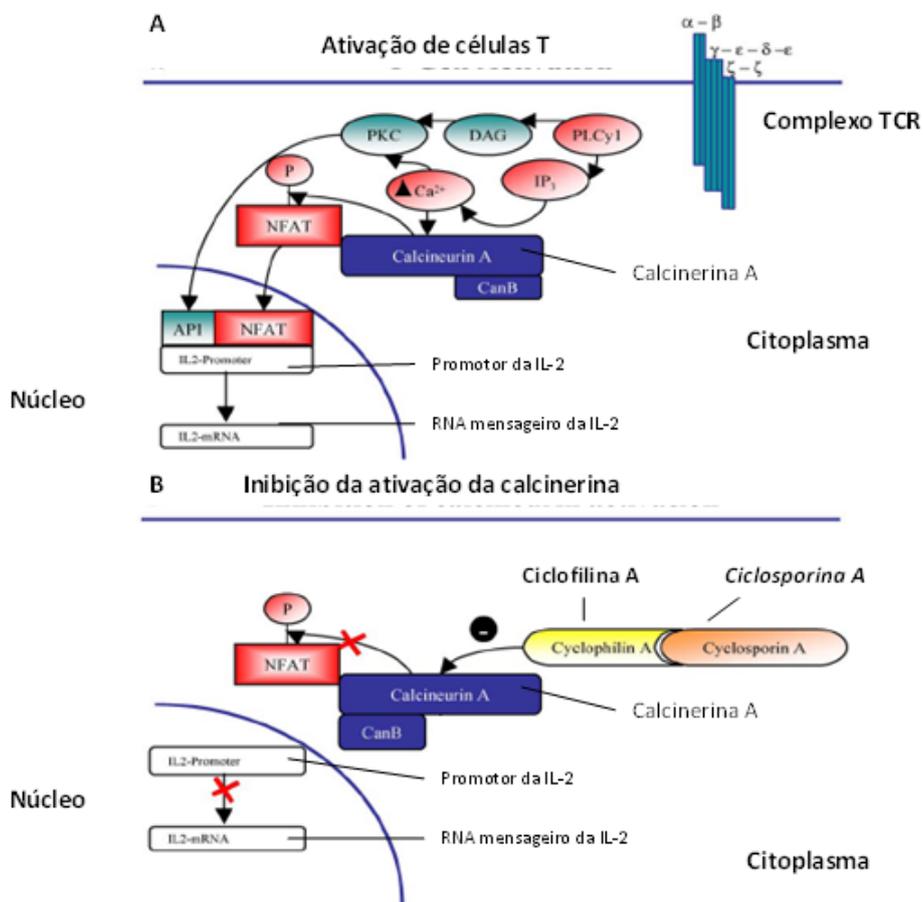


FIGURA 19 - Representação: (a) da ativação de linfócitos T e (b) do mecanismo de ação da CsA.

Fonte: Adaptação de Rezzani (2004, p.90).

Quando o organismo é exposto a um agente patológico, o sistema imune é ativado a fim de eliminá-lo. As células apresentadoras de antígenos fagocitam os patógenos e os metabolizam de forma a expor, por intermédio do receptor celular chamado complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) o antígeno em fragmentos peptídicos.

Segundo Rezzani (2004), o mecanismo natural de ativação de células T acontece quando o complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) de células apresentadoras se liga, especificamente, no receptor de células T (TCR). A ligação MHC II-TCR originará sinais intracelulares que ativará a enzima tirosina quinase por meio da desfosforilação. Essa enzima promoverá a quebra da fosfolipase C (PLCγ1) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃). O PLCγ1, na presença de cálcio intracelular, ativa a fosfoquinase C (PKC), que é responsável pela ativação da chamada AP1, região promotora de genes responsável da IL-2. Já o IP₃ estimula a liberação de cálcio

armazenado no retículo endoplasmático. O cálcio intracelular se liga à calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina, como sendo um segundo mensageiro. Este, ao se ligar a *calcineria A* formará um complexo capaz de desfosforilar e ativar o fator de transcrição de células T (NFAT), a outra região promotora de genes de IL-2 e conseqüentemente a produção da proteína IL-2. Depois de formada, a citosina é então exteriorizada (Figura 19a).

A inibição da produção de IL-2 é realizada pela CsA (Figura 19b). No citoplasma ela se liga a uma proteína intracelular nomeada ciclofilina (CI; ciclofilina A). O complexo fármaco-imunofilina (ciclosporina-CI) se liga à calcinerina bloqueando o sistema a fosforilação mediada pelo sistema calcinerina-calmodulina. Assim, não há ativação de NFAT, não ocorrendo a ativação de células T e, conseqüentemente, a liberação de Interleucina 2 (Bertelmann; Pleyer, 2004; AHFS Drug Information, 2000; Rezzani; 2004).

A primeira formulação registrada contendo a CsA (Sandimmune®, Novartis, Suíça) foi desenvolvida na forma de emulsão concentrada. Posteriormente foi lançada a microemulsão (Neoral®, Novartis, Suíça), formulação que apresentou melhor biodisponibilidade e eficácia, quando comparado com a primeira (Jabs et al., 2000; Andrysek et al., 2003; Pollard et al., 2003). Encontra-se também no mercado, o fármaco disponibilizado em cápsulas gelatinosas (Sandimmune®), Sandimmune Neoral® suspensão (Italia et al., 2007) e soluções oleosas de administração parenteral (Sandimmune® IV), conforme AHFS Drug Information (2000) e Jabs e colaboradores (2000).

2.6 Utilização clínica da CsA em oftalmologia

A administração sistêmica de CsA foi introduzida com o intuito de prevenir a rejeição de tumores sólidos em 1983 e é atualmente utilizada no tratamento de tumores no rim, coração, fígado e pulmão, como também para o tratamento da doença de Behçet e na quimioterapia para combate à retinoblastoma em associação a outros fármacos (Donnenfeld et al., 2009).

Atualmente a CsA é utilizada na oftalmologia para tratamento da uveíte decorrente da doença de Behçet, uveíte por sarcoidoses, uveíte e esclerite idiopática. Para atingir a dose terapêutica de 3 a 10 µg/mL no tecido atingido,

doses diárias próximas de 5 a 15 mg/Kg (dependente da formulação administrada) são administradas por via oral ou endovenosa resultando em uma concentração sanguínea de 200 a 400 ng/mL, esta responsável pelos casos de nefrotoxicidade, hipertensão, hiperplasia gengival, aumento de infecções oportunistas. A administração oral é comumente utilizada para tratamento artrite reumatoide, psoríase moderada e severa, doenças inflamatórias ósseas e como combinação a outras terapias medicamentosas (Donnenfeld et al., 2009).

Diferente da terapia antitumoral e da prevenção de rejeição a transplantes, é utilizada na oftalmologia em doses sistêmicas diárias mais baixas entre 2,5 e 5 mg por kilo mg/kg/dia e a concentração sérica entre 75 a 100 µg/mL são encontradas (Donnenfeld et al., 2009). Trabalhos mostram sua eficácia no tratamento da uveíte posterior em adultos e crianças (Walton et al., 1998; Kulkarni, 2001; Lallemand et al., 2003; Hesselink et al., 2004). BenEzra e colaboradores (1990) mostraram a distribuição da CsA no sangue, saliva, lágrima, humor aquoso, vítreo, após administração diária oral com 5 mg por kilo (mg/kg/dia) ou por meio da aplicação tópica de 2% de fármaco.

A administração das formulações descritas acima destinada para o tratamento da doença apresenta várias desvantagens quando se analisa a sua capacidade de disponibilizar a CsA nas porções posteriores do bulbo do olho na dose efetiva e sem ocasionar efeitos colaterais. O fármaco, devido a sua baixa solubilidade em água (40µg de fármaco por mL de água), baixo coeficiente de partição óleo/água e elevada massa molecular (AHFS Drug Information, 2000; Bertelmann; Pleyer, 2004; Donnenfeld et al., 2009), não atravessa, de forma satisfatória, as barreiras teciduais e a barreira hematorretiniana do bulbo do olho, apresentando baixa penetrabilidade.

Visto os inconvenientes da administração da CsA por vias convencionais para o tratamento da uveíte posterior resistente à terapia com corticoides e os efeitos tóxicos causados pela molécula, é de interesse científico a busca de novos sistemas de liberação que possibilitem a sua disponibilização de forma efetiva e segura.

2.6.1 Sistemas de liberação de fármacos contendo CsA

A literatura relata diversos trabalhos que propõem alternativas para administração oral da CsA, objetivando melhorar o comportamento farmacocinético, a biodisponibilidade, a solubilidade e o perfil de liberação do fármaco (Quadro 3).

QUADRO 3
Formas farmacêuticas de veiculação de CsA.

Forma Farmacêutica	Resultados encontrados	Referências
Lipossomas composto por dipalmitoilfosfaditilcolina (DPPC) e colesterol (Chol).	Melhora na biodisponibilidade da CsA quando comparado com a formulação comercial Sandimmune®.	Al-Meshal et al., 1998.
Nanopartículas poliméricas de (PLGA) e polietilenoglicol (PEG).	São capazes de promover uma liberação controlada do fármaco, quando em presença do fluido natural intestinal.	Jaiswal et al., 2004.
Micelas de copolímero metoxipoli (óxido de etileno)-b- (poli-ε-caprolactona) (POE-b-PCL).	Além de apresentar um perfil de liberação sustentada, o sistema foi capaz aumentar a solubilidade do fármaco.	Aliabadi et al., 2005b.
Micelas compostas pelo copolímero metoxipoli (óxido de etileno)-b- (poli-ε-caprolactona) (POE-b-PCL).	Melhor biodisponibilidade e diminuição dos efeitos adversos sistêmicos em comparação com (Sadimmune).	Aliabadi et al 2005a.
Microesferas de poli lático-b-caprolactona (P(LA-b-CL).	Capacidade de liberação prolongada.	Li et al., 2005.
Nanopartículas poliméricas de PLGA.	Melhor biodisponibilidade redução da toxicidade comparado com o medicamento comercial. Neoral®	Italia et al., 2007.
Vesículas lipídicas para aplicação cutânea.	Melhora na biodisponibilidade da CsA.	Liu et al., 2006.

Fonte: Elaborado pela autora.

Al-Meshal e colaboradores (1998) observaram uma melhora na biodisponibilidade do fármaco em lipossomas composta por dipalmitoilfosfaditilcolina (DPPC) e colesterol (Chol), quando comparado com a formulação comercial Sandimmune®.

Jaiswal e colaboradores (2004) mostraram que nanopartículas poliméricas de polímeros biodegradáveis de (PLGA) e polietilenoglicol (PEG) são capazes de promover uma liberação controlada do fármaco, quando em presença do fluido natural intestinal.

Aliabadi e colaboradores (2005b) também mostraram vantagens dos SLM ao investigarem a possibilidade da utilização de micelas compostas pelo copolímero metoxipoli (óxido de etileno)-b- (poli- ϵ -caprolactona) (POE-b-PCL) em diferentes proporções de PCL como veículo para melhorar a solubilidade e liberação da CsA. Comparando-se com a fórmula comercial contendo o Cromophor EL, o autor observou que a micela polimérica, além de apresentar um perfil de liberação sustentada, foi capaz de aumentar a solubilidade aquosa do fármaco.

Dando continuidade ao trabalho, Aliabadi e colaboradores (2005a) verificaram o potencial das mesmas micelas em modificar a farmacocinética e distribuição da CsA nos tecidos, em comparação com a fórmula para aplicação intravenosa (Sandimmune). Em ratos, o sistema micelar proporcionou uma melhor biodisponibilidade do medicamento, já que o aumento da solubilidade proporcionou a alteração da sua biodistribuição nos rins e fígado, diminuindo sua metabolização hepática e seus efeitos tóxicos nos referidos órgãos.

A encapsulação da CsA em microesferas poliméricas e a avaliação do seu perfil de liberação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foram realizadas por Li e colaboradores (2005), comparando com suspensões de CsA, observaram um perfil de liberação controlada em ambos os estudos.

A aplicação tópica da CsA para o tratamento de doenças dérmicas autoimunes, como por exemplo a psoríase, e a necessidade de promover maior permeação do fármaco também tem sido investigado. Liu e colaboradores (2006) avaliaram a capacidade de vesículas lipídicas em melhorar a permeabilidade do fármaco na superfície da pele.

Italia e colaboradores (2007) observaram, em teste *in vitro*, boa biodisponibilidade de nanopartículas poliméricas do copolímero PLGA contendo CsA quando comparados com os resultados obtidos como medicamento comercial Neoral® e de suspensões de CsA.

Para a administração no segmento anterior, o desenvolvimento de SLM descritos na literatura objetiva melhorar a penetrabilidade da CsA, aumentar sua estabilidade, minimizar seus efeitos tóxicos e prevenir rejeição à transplantes de córnea (Quadro 4).

QUADRO 4
Formas farmacêuticas de veiculação de CsA em oftalmologia no segmento anterior

Forma Farmacêutica	Resultados encontrados	Referências
Colírio contendo α -ciclodextrina (α -CD).	Menor toxicidade corneal e uma penetração na córnea cinco a dez vezes maior que o fármaco no veículo lipofílico.	Kanai et al., 1989.
Lipossoma	Melhoria no transporte de CsA para os tecidos oculares comparado ao veículo oleoso.	Pleyer et al., 1994.
Nanocápsulas e nanoesferas de PCL.	A absorção corneal foi cinco vezes superior com nanocápsulas quando comparada ao veículo oleoso.	Alonso et al., 1995.
Microesferas de PLGA para via subconjuntival.	Possível eficácia na prevenção de rejeição do transplante da córnea e ausência de efeitos adversos.	Silva et al., 1999.
Microesferas de PLGA.	Possível eficácia na prevenção de transplante da córnea em modelo <i>in vitro</i> .	Valladolid et al., 2002.
Matriz polimérica sólida a base de silicone para aplicação episcleral.	Ausência de toxicidade tecidual e celular e potente sistema para prevenção de rejeição no transplante de córnea.	Lee et al., 2007.
Nanopartículas lipídicas sólidas.	Biocompatibilidade em células da córnea e satisfatória permeabilidade da CsA em modelo <i>in vitro</i> de córnea.	Gokce et al., 2008.
Nanoesfera a base de policaprolactona, ácido hialurônico.	Maior penetrabilidade do fármaco na córnea de coelhos e menor permanência na lágrima.	Yenice et al., 2008.
Reservatório de metacrilato no canal lagrimal.	Liberação prolongada por três meses.	Gupta et al., 2010.
Nanopartículas polimérica de PLGA, eudragit e carbopol. E CsA para tratamento da ceratoconjuntivite seca.	Viabilidade de aplicação, liberação prolongada e adequada permeação da CsA <i>in vitro</i> em células da córnea.	Aksungur et al., 2011.

Fonte: Elaborado pela autora.

Kanai e colaboradores (1989) testaram combinações diferentes de α -ciclodextrina (α -CD) e CsA e observaram que o colírio contendo o complexo de CsA- α -CD resultou em uma menor toxicidade corneal e uma penetração na córnea cinco a dez vezes maior que o fármaco no veículo lipofílico.

Pleyer e colaboradores (1994) investigaram a habilidade de lipossomas transportarem CsA para os tecidos oculares. A formulação foi aplicada topicamente em gotas oleosas (controle) e em uma forma encapsulada em lipossoma. O estudo mostrou claramente a superioridade dos lipossomas sobre o veículo oleoso.

Alonso e colaboradores (1995) mostraram que nanocápsulas e nanoesferas de poli- ϵ -caprolactona, e nanoemulsões promoveram absorção corneal de fármacos lipofílicos (Ciclosporina e indometacina). Eles mostraram que a absorção corneal da CsA foi cinco vezes superior com nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona quando comparada à solução oleosa da droga.

A eficácia na prevenção da rejeição de transplante da córnea por meio de sistemas de liberação de fármacos foi avaliada por diferentes autores. Microesferas de PLGA contendo CsA para aplicação subconjuntival foi desenvolvida por Silva e colaboradores (1999). A ausência de possíveis efeitos adversos sistêmicos foi sugerida já que não foi detectada a presença do fármaco na circulação sanguínea. Valledado e colaboradores (2002) confirmaram esses resultados por meio da avaliação *in vitro* em modelo queratoplástico. Ainda, Lee e colaboradores (2007) desenvolveram e avaliaram uma matriz polimérica sólida a base de silicone para aplicação episcleral cuja ausência de toxicidade tecidual e celular enquadra o sistema como potente alternativa para prevenir rejeição após transplante de córnea.

Objetivando o desenvolvimento de um sistema de liberação prolongada da CsA para utilização tópica, Gokce e colaboradores (2008) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas e demonstraram satisfatória a permeabilidade da CsA em modelo *in vitro* bem como a sua compatibilidade quando em contato com células da córnea.

A determinação dos níveis de CsA foi realizada na córnea de coelhos após a administração tópica de nanoesfera a base de policaprolactona e ácido hialurônico contendo diferente quantidade de CsA na córnea de coelhos.

Resultados satisfatórios foram detectados uma vez observados a maior concentração de fármaco no segmento anterior e menor concentração na lágrima nas formulações que continham a maior quantidade de fármaco (Yenice et al., 2008).

Visando o tratamento da ceratoconjuntivite seca, Gupta e colaboradores (2010) desenvolveram um sistema reservatório a base de metacrilato contendo CsA para inserção no canal lagrimal onde o fármaco é liberado durante três meses. Ainda, Aksungur e colaboradores (2010) comprovaram a viabilidade de nanopartículas polimérica de PLGA, eudragit e carbopol uma vez observado um perfil de liberação prolongada do fármaco, a ausência de toxicidade e adequada permeabilidade da CsA em modelos *in vitro* contendo células da córnea.

Entre os sistemas de liberação modificada, os implantes poliméricos biodegradáveis são sistemas viáveis para o tratamento de doenças oculares do segmento posterior, uma vez que disponibilizam o fármaco no tecido alvo e minimizam consideravelmente os seus efeitos indesejáveis (Jaffe et al., 1998; Gilger et al., 2000; Dong et al., 2006).

A disponibilização da CsA no segmento posterior é ainda uma tarefa desafiadora e pouco explorada. Alguns estudos descritos na literatura relatam a eficácia de SLF em reduzir a inflamação intraocular, porém com algumas limitações (Quadro 5).

QUADRO 5
Formas farmacêuticas de veiculação de CsA em oftalmologia no segmento posterior

Forma Farmacêutica	Resultados encontrados	Referências
Implante polimérico não biodegradável avaliados em modelo de UIE em coelhos.	Ocorreu a liberação prolongada, reversível diminuição das ondas B observadas pelo ERG, opacidade corneana e diminuição da inflamação intraocular.	Pearson et al., 1996.
Implante polimérico não biodegradável de PVA em UIE em coelhos.	A CsA foi liberada por seis meses e manutenção da amplitude das ondas B bem como a redução do processo inflamatório.	Jaffe et al., 1998.
Implante não biodegradável de PVA e acetato de vinietileno em UIE em cavalos.	Boa tolerância do implante após dezesseis dias. Não se observou a diminuição das ondas B. Células inflamatórias foram detectadas próximo ao local de implantação.	Jaffe et al., 2000.
Microesferas de PLGA para injeção intravítrea.	O sistema foi capaz de liberar 25% do fármaco em seis meses em estudos <i>in vitro</i> . A sua injeção intravítrea reduziu a inflamação.	He et al., 2006.
Implantes biodegradáveis de PLGA-PCL em modelos de UIE.	Observou-se redução da inflamação por seis meses. Nenhuma alteração foi encontrada pelos estudos pré-clínicos e ERG empregados.	Dong et al., 2006.

UIE = uveíte induzida por endotoxinas

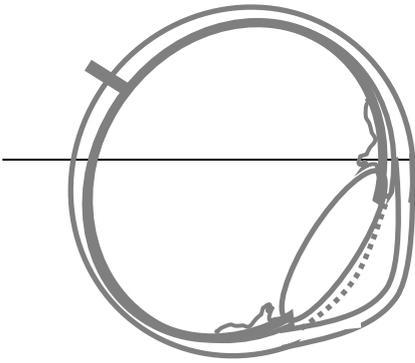
Fonte: Elaborado pela autora.

Pearson e colaboradores (1996), Jaffe e colaboradores (1998) e colaboradores (2000) e Gilger e colaboradores (2000) avaliaram a eficácia de diferentes implantes intraoculares não biodegradáveis contendo a CsA os quais mostraram-se eficazes para o tratamento da doença em modelos de uveíte desencadeada por endotoxinas (UIE). A grande desvantagem desses sistemas é a necessidade de remoção cirúrgica após o tratamento. Dong e colaboradores (2006) mostraram, com sucesso, a possibilidade de tratamento

da modelos UIE em coelhos a partir de implantes intraoculares biodegradáveis constituídos do PLGA e ϵ – caprolactona contendo CsA. Porém, este sistema foi capaz de liberar o fármaco durante quatorze semanas, um fator limitante para o tratamento de uveítes posteriores resistentes à terapia com corticoides.

Frente à necessidade de melhorar as formas de tratamento da uveíte posterior resistente à terapia com corticoides por meio da disponibilização de doses terapêuticas e não tóxicas da CsA por um longo período, nosso grupo desenvolveu, caracterizou e avaliou por meio de estudos *in vitro*, um novo implante biodegradável a partir do PLGA 75:25 e CsA. O processo de obtenção baseou-se na moldagem à quente da mistura liofilizada do polímero e do fármaco, uma técnica de fácil manuseio que permitiu a obtenção de cilindros de pequenas espessuras e tamanho. Os resultados encontrados na caracterização dos implantes obtidos comprovam que o fármaco se encontra na sua forma ativa e devidamente disperso na matriz polimérica. Adicionalmente, os estudos *in vitro* mostraram um perfil de liberação da CsA prolongado onde apenas 8,4% do fármaco foi liberado em 23 semanas em duas etapas distintas pelo mecanismo de difusão pela matriz polimérica intumescida e porosa (Saliba et al., 2008, vide anexo).

Visto a promissora aplicação do sistema desenvolvido, tem-se como objetivo dessa tese dar continuidade à avaliação da aplicabilidade do sistema como uma alternativa no tratamento da doença em questão. Para tanto, a farmacocinética foi avaliada *in vivo* e o tempo de liberação da CsA foi determinado. Ainda, avaliou-se a sua biocompatibilidade por meio da avaliação clínica, da análise histopatológica e da toxicidade na função retiniana de coelhos.



Objetivos

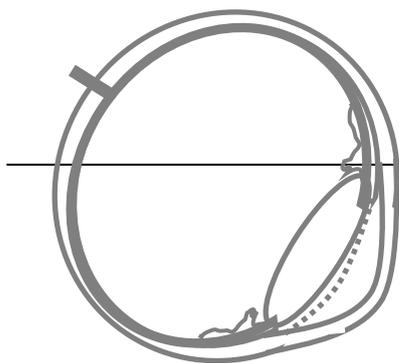
3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar a viabilidade e a segurança da utilização de implante biodegradável obtido a partir do copolímero ácido láctico e ácido glicólico (PLGA 75:25) contendo Ciclosporina A (CsA) com o intuito de tratar a uveíte posterior resistente à terapia com corticoides.

3.2 Objetivos específicos

- a) Validar o método de análise da CsA por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de Espectroscopia de Massa (CLAE/EM).
- b) Avaliar o perfil de liberação da CsA a partir da matriz polimérica por meio da determinação do mecanismo e da cinética de liberação do fármaco em estudos envolvendo experimentos em coelhos da raça New Zealand.
- c) Determinar o tempo de permanência da CsA na cavidade vítrea por meio da avaliação do perfil farmacocinético *in vivo* do fármaco.
- d) Avaliar a segurança da utilização do implante em experimentos *in vivo* por meio de estudos pré-clínicos e da avaliação do efeito tóxico na estrutura e na função retiniana.



Materials e métodos

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Materiais

- Ciclosporina A: massa molecular de 1202 g/mol, teor de pureza de 98% - Sigma Pharma, Brasil.
- Ciclosporina A padrão USP, teor de pureza de 99% - Sigma Aldrich, Brasil
- Ciclosporina A - solução oral, Sandimmun Neoral®, Novartis, EUA.
- Tamoxifeno, teor de pureza de 99% – Sigma Aldrich, Brasil.
- Copolímero ácido láctico / ácido glicólico na proporção de 75:25: i.v (viscosidade intrínseca) aproximada de 0,8 CP – Resomer RG 756, Boehring Inselheim, Alemanha.
- Acetonitrila - J.T Baker.
- Acido fórmico - J.T Baker.
- Agua ultra pura – Mili-Q.
- Cetamina - Ketamin®, Cristália, Brasil.
- Cloridrato de xilasina - Copanize®, Schering-Plough Coopers, Brasil.
- Cloridrato de Tetracaína 1% + Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio®, Allergan, Inc, EUA).

4.2 Animais

Coelhos brancos machos New Zealand, *Oryctolagus cuniculus*, (2,0-2,4 Kg) adquiridos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) . Os animais foram criados e utilizados nos experimentos de acordo com as normas éticas estabelecidas pela resolução da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) para estudos envolvendo animais.

4.3 Métodos

4.3.1 Validação do método de análise da CsA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectroscopia de Massa (CLAE/EM)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de Espectroscopia de Massa (EM) foi a técnica escolhida para quantificação da CsA durante o estudo de liberação *in vivo*.

4.3.1.1 Preparo de soluções

Foram preparadas soluções estoques a 100 µg/mL de CsA e do Tamoxifeno (TMX), o padrão interno escolhido para verificação da eficiência da análise ao longo do estudo. A partir das soluções estoques, soluções contendo diferentes concentrações de CsA foram obtidas em acetonitrila a 100%. A solução de padrão interno (PI) foi preparada em acetonitrila a 4,0 ng/mL de TMX.

4.3.1.2 Preparo das amostras do vítreo para a validação: método de precipitação de proteínas

Os interferentes presentes no vítreo foram separados por meio do método de precipitação de proteínas na presença da acetonitrila (ACN). Para a precipitação dos constituintes do vítreo, 100 µL da solução de PI em ACN foram acrescentados a 100 µL da amostra do vítreo. Para separação do resíduo, o meio foi submetido à agitação em vortex (IKA® JK MS1) por 30 segundos e centrifugação (MR23i, JOUAN) a 15000 rpm por 5 minutos a -8 °C.

4.3.1.3 Preparo das amostras do vítreo para a avaliação da eficiência do método de precipitação de proteínas: estudos de recuperação do analito e do efeito da matriz

Para avaliação da recuperação do analito pelo método de precipitação de proteínas, foram acrescentados 60 µl e 400 µl da solução de CsA preparada em acetonitrila em 100 µl do vítreo contendo o PI e as amostras contendo 60 ng/mL e 400ng/mL de CsA foram obtidas. Para a avaliação do efeito da matriz foram obtidas três amostras nas concentrações de 20, 500 e 1000 ng/mL a partir da solução de CsA contendo o PI em 100 µl do sobrenadante do vítreo obtido após a precipitação de proteínas.

Para realização desses estudos, 50 µl das amostras preparadas no sobrenadante do vítreo (n=2) e na fase móvel (n=4) foram injetadas no CLAE. A área dos picos obtidos para cada amostra preparada foram comparadas.

4.3.1.4 Método analítico

Para validação do método analítico e quantificação da CsA, o método desenvolvido por Saliba e colaboradores (2008) foi adaptado em relação à temperatura de coluna e detector. Para tanto foi utilizado o cromatógrafo Waters®, equipado com bomba binária 1525 µ, injetor automático modelo 2777 plus, forno de colunas DCM/CHM à 65 °C acoplado a espectrômetro de massa Waters® Quatro LC. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna monolítica C18 Phenomenex® (100 x 4,6 mm) e fase móvel constituída de 30% de ácido fórmico 0,05% e 70% de ACN.

O tempo de corrida foi fixado em 6,5 minutos e os tempos de retenção foram de 1,6 minutos e 5,3 minutos para TMX e CsA respectivamente. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram a temperatura da fonte, temperatura de desolvatação, capilaridade e voltagem do cone extrator. Estes foram ajustados para 100 °C, 300 °C, 3 kV e 2 V respectivamente. A voltagem do cone e energia de colisão utilizadas foram 50 V e 42 V para a CsA e 40 V e 20 V para o TMX. Os cromatogramas foram obtidos nas transições de 1203.87 m/z a 1185.6 m/z para CsA e 372.2 m/z a 72.3 m/z para o padrão interno.

4.3.1.5 Validação

O procedimento adotado para a validação do método foi adaptado da resolução 899 de 29/05/2003 da ANVISA (Brasil, 2003) para a validação de métodos bioanalíticos. As adaptações se fizeram necessárias devido a pouca quantidade de vítreo disponível. Apenas uma curva analítica foi construída com vítreo contaminado nas condições de trabalho, e esta mesma curva foi utilizada para a análise das amostras. Para se comprovar a linearidade do método três curvas analíticas foram construídas em fase móvel contendo CsA padrão USP (Sigma Aldrich, Brasil), CsA (Sigma Pharma, Brasil) e em vítreo contendo CsA (Sigma Pharma, Brasil) na faixa de concentração de 20 ng/mL a 1000 ng/mL. Além dos pontos da curva analítica, amostras controle nas concentrações de 10 ng/mL, 60 ng/mL, 400 ng/mL e 1000 ng/mL foram analisadas para se verificar a exatidão e precisão do método. A precisão do método é expressa como desvio padrão relativo (DPR), sendo que não se admitem valores superiores a 15%, exceto para o limite de quantificação (LQI), para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, multiplicada por 100. A exatidão de métodos bioanalíticos deve estar compreendida entre 85% e 115%, exceto para o LQI, para o qual se admitem valores dentro da faixa de 80% a 120%.

4.3.1.6 Recebimento e armazenamento das amostras

As amostras de vítreo dos animais foram recebidas, conferidas e armazenadas sob refrigeração a -70 °C. Os microtubos estavam identificados com numeração idêntica a do implante utilizado e tempo de coleta.

4.3.2 Preparo dos implantes intraoculares

Os implantes foram preparados a partir de uma mistura liofilizada, segundo a metodologia desenvolvida por Saliba e colaboradores (2008). O fármaco e o polímero PLGA 75:25 foram solubilizados em quantidade suficiente de ACN, obtendo uma solução com uma proporção entre CsA e polímeros de 1:3. A solução foi congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por, no mínimo 24 horas e posteriormente liofilizada (Liofilizador E-C MODULYO, E-C Apparatus Inc. EUA). Uma massa homogênea contendo CsA foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Saliba e colaboradores (2008). As formulações foram preparadas na forma de implante sobre uma placa aquecida na temperatura entre 100 e $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, erro em torno de $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os implantes desenvolvidos apresentaram-se como um sistema compacto, na forma de um cilindro com aproximadamente $0,45$ de diâmetro, 6 mm de comprimento, massa de $1,1 \pm 0,09\text{ mg}$ e quantidade média de CsA incorporada de $353 \pm 0,03\text{ }\mu\text{g}$ (Figura 20).



FIGURA 20 - Fotografia dos implantes obtidos.

4.3.3 Inserção dos implantes na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos

Os estudos *in vivo* foram realizados empregando-se sessenta coelhos albinos Nova Zelândia de acordo com a resolução da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) para o uso de animais em pesquisa. Os coelhos foram anestesiados utilizando-se injeção intramuscular de 30 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina (Ketamin®, Cristália – 50 mg/mL), $4,0\text{ mg/Kg}$ de

Xilasina (Coopazine®, Schering-Plough Coopers – 20 mg/mL) e instilação tópica de Cloridrato de Tetracaína 1% e Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio®, Allergan).

Uma esclerotomia foi realizada no quadrante temporal superior a cerca de 2 mm do limbo utilizando-se o sistema de trocateres transesclerais de 25 G da Alcon. O implante foi inserido através da cânula transescleral a qual foi retirada após o procedimento finalizando a inserção. Nenhuma sutura foi necessária já que a esclerotomia é auto-selante, Figura 21.

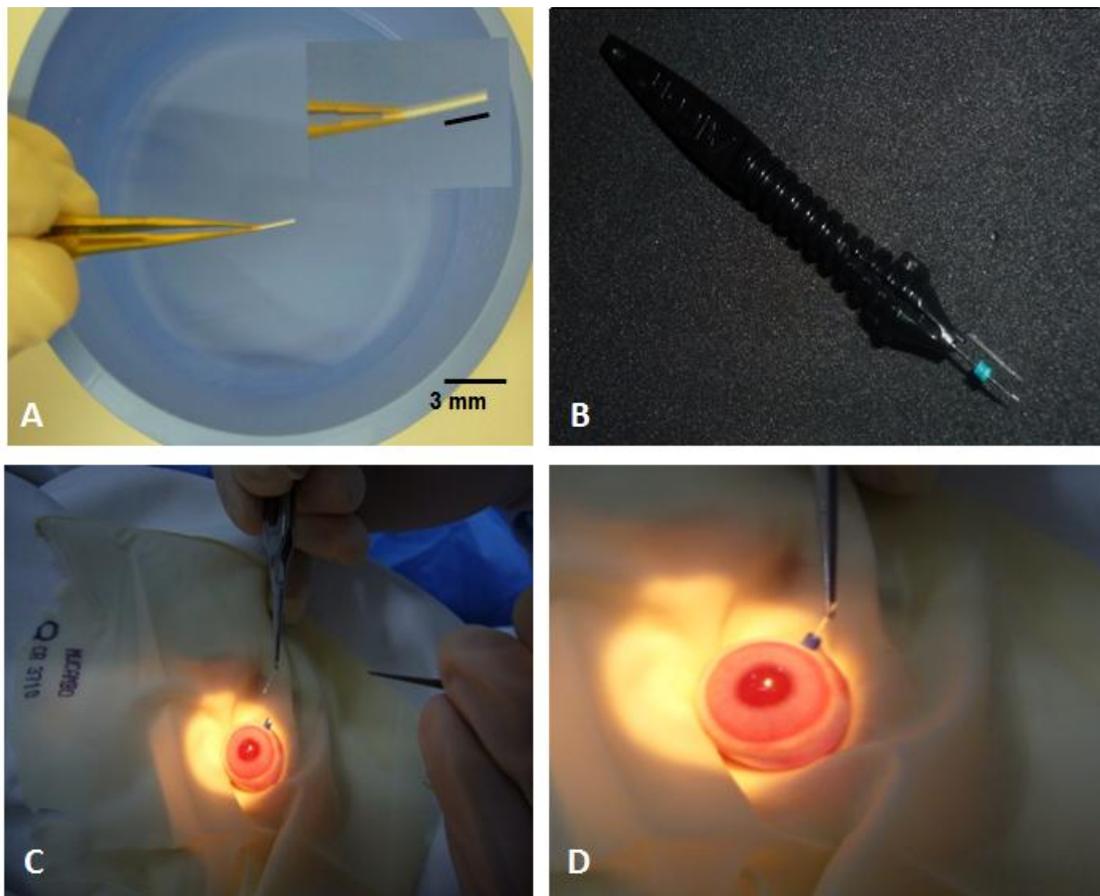


Figura 21 - Procedimento de inserção do implante intraocular: (a) O implante polimérico a ser inserido na cavidade vítrea, (b) Trocater Transescleral (Accurus® 25 – Gauge System, Alcon, Inc, EUA), (c) e (d) Procedimento cirúrgico de inserção dos implantes intraoculares na cavidade vítrea do bulbo do olho dos coelhos.

4.3.4 Obtenção do vítreo

Trinta e dois animais receberam o implante contendo a CsA no olho esquerdo (grupo I) e dezesseis animais receberam o implante sem o fármaco

(grupo II). Em ambos os grupos, os olhos direitos não receberam o sistema (olho controle). Os coelhos foram sacrificados sob anestesia profunda e em seguida, decapitados e o vítreo foi totalmente retirado e conservado a -80°C . O vítreo dos olhos dos controles e daqueles que receberam o implante sem o fármaco (grupo II) foi utilizado para validação do método descrito no item 4.3.1. O vítreo dos olhos que receberam o implante contendo CsA (grupo I) foram utilizados para quantificação da CsA.

4.3.5 Determinação da quantidade de CsA liberada no vítreo a partir da matriz polimérica

A quantidade em porcentagem de CsA liberada no vítreo a partir dos implantes intraoculares foi calculada por meio da diferença entre a quantidade inicial de fármaco e quantidade restante no implante. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão (n= 4).

4.3.6 Determinação da CsA nos implantes

O teor total de CsA presente nos implantes intraoculares, antes e após o estudo de liberação *in vivo* foi determinada após a solubilização dos implantes solubilizados em acetonitrila (ACN). O método cromatográfico empregado foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de Ultra Violeta (CLAE/UV) desenvolvido para a quantificação da CsA em presença de produtos de degradação do PLGA 75:25 descrito por Saliba e colaboradores (2011). Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão (n= 4).

4.3.7 Determinação da CsA presente no vítreo

A quantidade de CsA presente no vítreo durante sete semanas de estudo *in vivo* obtidos dos olhos dos animais do grupo I foi quantificada pelo método descrito no item 4.3.1. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão (n= 3).

4.3.8 Proposta dos mecanismos de liberação da CsA nos estudos *in vivo*

A proposição do mecanismo de liberação do fármaco a partir do implante intraocular foi determinada a partir das quantidades de CsA liberadas durante o estudo de liberação *in vivo* em um período de 8 semanas. A análise foi realizada por meio de dois modelos teóricos matemáticos que descrevem o processo de difusão matricial de fármacos descritos por Higuchi (Kunou et al., 1995; Schiliecker et al., 2003; Siepman et al., 2008) e Korsmeyer-Peppas (Schiliecker et al., 2003; Siepman et al., 2008).

Segundo o modelo de Higuchi, o perfil de liberação de um fármaco a partir de uma matriz homogênea pode ser representando pelas equações (1-3):

$$F = [D(2C_0 - C_s)C_s t]^{1/2} \quad (1)$$

Em que: F= quantidade de fármaco liberado por unidade de área em um tempo específico

C_0 = concentração de fármaco original no veículo (matriz polimérica)

C_s = limite de solubilidade do fármaco no veículo

D= difusibilidade do fármaco no veículo

t= tempo

Considerando $C_0 \gg C_s$, a equação é simplificada como:

$$F = [2C_0 D C_s t]^{1/2} \quad (2)$$

Em que: F= quantidade de fármaco liberado por unidade de área em um tempo específico

C_0 = concentração de fármaco original no veículo (matriz polimérica)

C_s = limite de solubilidade do fármaco no veículo

D= difusibilidade do fármaco no veículo

t= tempo

A equação (3) indica que a quantidade de fármaco liberado é diretamente proporcional à raiz quadrada do tempo. Isso significa que, quando ocorre relação linear entre a concentração liberada *versus* raiz quadrada do tempo, a liberação do fármaco a partir da matriz homogênea ocorre por um processo controlado pela difusão (Kunou et al., 1995).

$$F = K_H \cdot t^{1/2} \quad (3)$$

Em que: F= quantidade de fármaco liberado por unidade de área em um tempo específico

K_H = constante de difusão do fármaco do veículo

t= tempo

Para tanto, um gráfico relacionando concentração do fármaco acumulada e raiz quadrada o tempo de liberação foi construído e a relação foi avaliada pela determinação do coeficiente de relação (r^2) da equação obtida. O processo de difusão do fármaco é então atribuído para r^2 for maior que 0,99 (Quadro 6)

Para sistemas que não se enquadram no modelo de Higuchi, a análise pode ser realizada aplicando-se o modelo de Korsmeyer-Peppas. Segundo Siepmann e colaboradores 2008, esse modelo representa mecanismos de liberação que não acontecem segundo o modelo de Fick, considerado comportamento anômalo (Quadro 6). O modelo pode ser descrito pelas equações (4-5):

$$Mt/M_\infty = kt^n \quad (4)$$

Em que: Mt= quantidade de fármaco liberado por tempo (t)

M_∞ = quantidade de fármaco liberada em um tempo infinito (∞)

K= constante da cinética de difusão do veículo

n= liberação exponencial do fármaco do veículo.

$$F = K_p \cdot t^n \quad (5)$$

Em que: F= quantidade de fármaco liberado por unidade de área em um tempo específico

k_p = constante da cinética de difusão do veículo

t= tempo

Os valores de n estão relacionados à forma geométrica do sistema de liberação e determina o mecanismo de liberação do fármaco. Para sistemas cilíndricos, fármacos liberados pelo processo de difusão através de poros presentes na matriz originam valores de n menores que 0,45, para liberação controlada por difusão fickiana, n maiores que 0,89 caracterizam uma

liberação de ordem zero cujo fármaco é liberado pela sua difusão da matriz intumescida, enquanto valores de n entre 0,45 e 0,89 indica a ocorrência de um transporte anômalo não fickiano, onde a liberação é determinada por diferentes fenômenos não esclarecidos pelo modelo.

Para determinação dos valores da inclinação da reta (n) e do coeficiente de correlação (r^2), um gráfico relacionando o logaritmo da porcentagem e quantidade de liberação da CsA e o logaritmo do tempo em semanas e dias para os estudos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, foi construído utilizando a equação 4. O modelo é válido se o valor atribuído para r^2 for maior que 0,99 (Quadro 6).

QUADRO 6
Modelos de liberação aplicados.

Modelo	Equação	Descrição do modelo	Referência
Higuchi	$F = K_H \cdot t^{1/2}$	Liberação difusão-controlada $R^2 \geq 0.99$	Kunou et al., 1998 Siepmann et al., 2008
Peppas	$F = K_p \cdot t^n$	Condição para o modelo (cilindro) $R^2 \geq 0.99$ Difusão fickiana $n \leq 0.45$ Transporte anômalo não fickiano $0.45 \leq n \leq 0.89$ Transporte de zero ordem intumescimento da matriz $n \geq 0.89$	Nochowski et al., 2008 Siepmann et al., 2008

4.3.9 Avaliação da degradação da matriz polimérica

Para avaliação da degradação da matriz polimérica, nos intervalos de tempo determinados, os implantes obtidos durante o estudo *in vivo* foram secados em estufa à vácuo e pesados com o objetivo de determinar a perda de massa polimérica. Um gráfico relacionando a perda de massa do implante e tempo de permanência no vítreo foi construído, cujos dados foram

apresentados como porcentagem de perda de massa em relação à massa total do implante sólido.

4.4 Avaliação da farmacocinética *in vivo*

4.4.1 Determinação da taxa de eliminação da CsA do vítreo

A taxa de eliminação CsA foi expressa tanto em porcentagem liberada por semana quanto em quantidade de CsA eliminada por dia durante as sete semanas do estudo *in vivo*. Os resultados de eliminação foram obtidos pela diferença entre a quantidade liberada de fármaco e a quantidade determinada no vítreo. A partir do valor obtido, foi calculada a porcentagem de eliminação considerando como 100% a concentração liberada no vítreo a partir dos implantes inseridos na cavidade vítrea. Um gráfico foi construído relacionando porcentagem de eliminação versus semanas. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão (n= 4).

A taxa de eliminação encontrada foi posteriormente utilizada para calcular a quantidade (em nanogramas) de CsA eliminada por dia, considerando como 100% a quantidade liberada no vítreo referente à cada semana.

4.4.2 Determinação do tempo de meia vida da CsA no vítreo

Para avaliação da farmacocinética de eliminação e determinação do tempo de meia vida do fármaco, um gráfico relacionando a quantidade de CsA restante no vítreo e tempo em dias relativo às sete primeiras semanas de estudo *in vivo* foi construído. A relação foi avaliada pela determinação do coeficiente de relação (r^2), K e $t_{(1/2)}$ a partir da obtenção da equação matemática (Schliecker et al., 2004; Kim et al., 2006):

$$C_{(t)} = C_{(0)} \exp^{-kt} \quad (6)$$

Em que: $C(t)$ = concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do fármaco em um determinado tempo experimental

$C_{(0)}$ = concentrações ($\mu\text{g/mL}$) restante no vítreo

K = constante de eliminação

$t_{(1/2)}$ = tempo de meia vida de eliminação do fármaco

Para determinação da quantidade de CsA restante no vítreo por dia, foi necessário determinar a taxa de eliminação diária de CsA, segundo as equações (7-9):

$$\% \text{Tx (s)} = (C_{(i)} - C_{(L)} - C_{(V)}) \times 100 / C_{(L)} \quad (7)$$

Em que: Tx (s) = taxa de eliminação em porcentagem de CsA por sete dias

Tx (d) = taxa de eliminação em porcentagem de CsA por dia

$C_{(i)}$ = concentração de CsA ($\mu\text{g/mL}$) inicial

$C_{(L)}$ = concentração de CsA ($\mu\text{g/mL}$) liberada

$C_{(V)}$ = concentração de CsA ($\mu\text{g/mL}$) no vítreo

$$\text{Tx (d)} = \% \text{Tx (s)} \times C_{C(0) (s)} / 7 \quad (8)$$

Em que: Tx (s) = taxa de eliminação em porcentagem de CsA por sete dias

Tx (d) = taxa de eliminação em porcentagem de CsA por dia

$C_{(i)}$ = concentração de CsA ($\mu\text{g/mL}$) inicial

$C_{(L)}$ = concentração de CsA ($\mu\text{g/mL}$) liberada

$C_{(V)}$ = concentração de CsA ($\mu\text{g/mL}$) no vítreo

$C_{C(0) (s)}$ = quantidade de CsA em μg presente no vítreo após sete dias

$$C_{C(0) (d)} = C_{C(0) (d-1)} - \text{Tx (d)} \quad (9)$$

Em que: $C_{C(0) (d)}$ = quantidade de CsA em μg presente no vítreo após um dia

$C_{C(0) (d-1)}$ = quantidade de CsA em μg referente ao dia anterior

Tx (d) = taxa de eliminação em porcentagem de CsA por dia

4.5 Avaliação da segurança da utilização do implante *in vivo*

4.5.1 Observação clínica

A avaliação da toxicidade e biocompatibilidade foram realizados por meio de ensaios pré-clínicos, eletrorretinográficos e histopatológico dos olhos dos animais, de acordo com o procedimento estabelecidos pelos departamento de oftalmologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.5.2 Exame de biomicroscopia

Os exames de biomicroscopia e oftalmoscopia binocular indireta (Topcon®, Japão) foram realizados em todos os animais antes e após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 semanas da realização do procedimento cirúrgico para a colocação do implante, por dois examinadores. Os seguintes dados pré-clínicos foram pesquisados: células e *flare* na câmara anterior, congestão dos vasos irianos, catarata, tonometria (tonopen), opacidade vítrea, descolamento de retina, dilatação dos vasos retinianos e neovascularização. A pressão intraocular (PIO) de ambos os olhos de cada coelho foi medida pelo equipamento (TonoPen®, Mentor Corporation, EUA) antes da cirurgia e em intervalos predeterminados.

4.5.3 Estudo histopatológico

Para a realização do estudo histopatológico foram utilizados doze coelhos escolhidos aleatoriamente que foram divididos em dois grupos (grupo III e IV). Nos seis animais do cada grupo III foram inseridos os implantes contendo CsA em ambos os olhos e nos seis animais do grupo IV foram inseridos os implantes sem o fármaco. Após oito semanas de estudo, os bulbos dos olhos foram removidos e colocados em solução fixadora livre dos tecidos externos.

A solução fixadora empregada para a preparação da amostra foi o formaldeído a 4% em tampão fosfato de Sorensen 0,1M, pH 7,2. Uma calota posterior do bulbo do olho foi separada por meio de uma incisão equatorial ao nível da inserção dos músculos retos, e, em seguida, dividida em duas metades por um corte transversal horizontal ao nível do nervo óptico, mantida no tampão por 24 horas, a 4 graus Celsius. Em seguida, foi desidratada em álcoois de concentração crescente de 25%, 50%, 75% v/v até o álcool absoluto. Do álcool absoluto, as metades foram transferidas para xilol, a seguir para uma mistura de xilol/parafina e, então, vários banhos de parafina a 60°C precederam o banho final, realizado em estufa a vácuo, durante 2 horas. Dos blocos foram produzidos cortes de 5µm micrômetros de espessura, em micrótomo Reichert-Jung, modelo RM 2065. A partir da observação dos cortes, corados a frio com azul de toluidina 1 %, foram obtidos registros fotográficos da retina e coróide utilizando-se o fotomicroscópio Axiophot (Carl Zeiss).

4.5.4 Estudo eletrofisiológico

A função retiniana foi avaliada por meio de eletrorretinograma (ERG) (Espion E2; Colordome; Diagnosys LLC), de acordo com o protocolo da International Society of Electrophysiology of Vision (ISCEV). Foi realizado um estímulo tipo flash, utilizando-se uma cúpula de Ganzfeld (Figura 22).

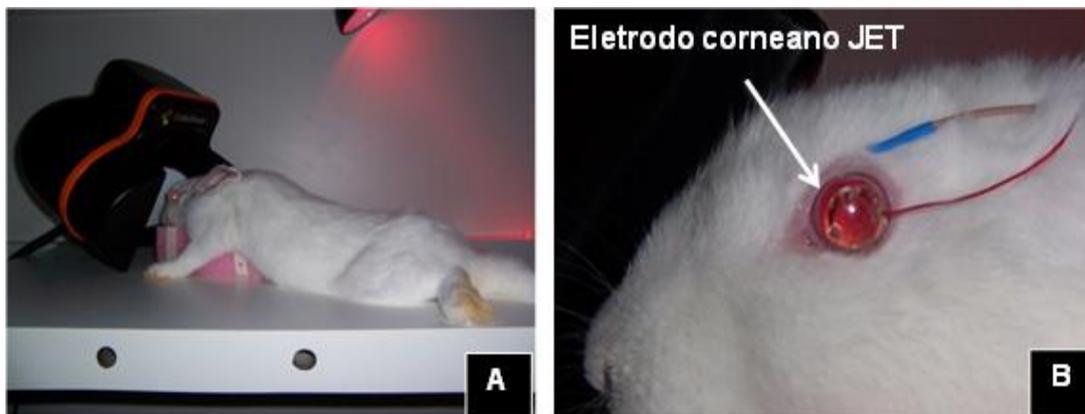


Figura 22 - O Eletrorretinograma (ERG). (a) posicionamento do animal para o exame da função retiniana, (b) o eletrodo colocado na superfície ocular.

O exame foi realizado em fase escotópica adaptação ao escuro durante 30 minutos, na qual foram estudados os bastonetes. Para tanto foram realizados os passos escotópico B, resposta máxima combinada e potenciais oscilatórios. A iluminância aplicada foi de 30. CD.s/cm².

Seis animais de cada grupo V e VI cujos implantes contendo ou não a CsA foram inseridos nos olhos esquerdos (OE), respectivamente, foram escolhidos aleatoriamente e submetidos ao exame de ERG vinte e quatro horas antes da inserção do implante, e no trigésimo segundo dia após a mesma.

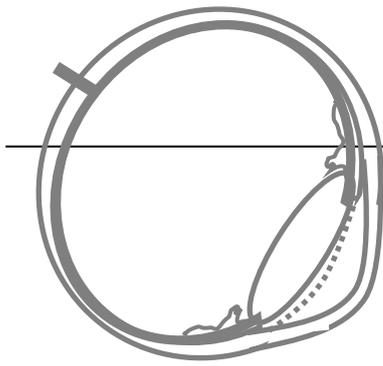
Os coelhos foram submetidos ao ERG sob anestesia com injeção intramuscular de 30mg/Kg de Cloridrato de Ketamina (Ketamin®, Cristália - 50mg/mL), 4,0mg/Kg de Xilasina (Coopazine®, Schering-Plough Coopers - 20mg/mL) e instilação tópica de Cloridrato de Tetracaína 1% + Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio®, Allergan). A partir do eletrorretinograma obtido nos animais de cada grupo, a amplitude das ondas A referente ao estímulo das células receptoras e B originada pelo estímulo emitido entre a sinapse elétrica entre fotorreceptores e células bipolares foram comparadas.

Para avaliação da toxicidade transitória da função retiniana, 35 µg de CsA (Sandimmun Neoral®, Novartis, EUA) foram injetados na cavidade vítrea em ambos os olhos de três animais. Durante quatro semanas, a medida das amplitudes das ondas A e B obtidas foram realizadas semanalmente. A toxicidade transitória foi calculada pela razão entre as amplitudes das ondas B e A. Valores iguais a 1 foram atribuídos à um ERG normal, este obtido logo após a injeção do fármaco.

4.6 Análise estatística

Para o estudo de liberação *in vivo*, foi realizada uma análise estatística descritiva pela determinação das médias aritméticas e dos desvios padrão dos valores que foram encontrados em cada semana. A análise estatística dos dados relativos à quantidade de CsA liberada no vítreo durante sete semanas de estudo e à avaliação quantitativa das amplitudes das ondas A e B no ERG

foi realizada pelo método paramétrico One-Way ANOVA, uma vez comparado dois ou mais grupos que assumem uma distribuição normal ou gaussiana. A análise compara uma única fonte de dados que varia com o tempo. A pós-análise de Tukey foi a escolhida já que é aplicada quando os resultados apresentam coeficiente de variação menor que 15%.



Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método de análise da *Ciclosporina A* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectroscopia de Massa (CLAE/EM)

O presente estudo visou validar o método bioanalítico adaptado de Saliba e colaboradores (2011, vide anexo) para a quantificação da CsA em vítreo de coelhos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector de Espectroscopia de Massas (EM) foi o método de escolha devido à necessidade de quantificação de concentrações muito pequenas, na ordem de nanogramas (ng) de CsA.

A viabilidade de aplicação do CLAE/EM foi investigada por meio: 1) da determinação do perfil de fragmentação da CsA e do TMX ao avaliar a eficiência do método de extração de proteínas por meio da técnica de recuperação do analito, 2) da avaliação da possível interferência dos resíduos do vítreo na ionização da CsA por meio do efeito de matriz, 3) da análise do perfil de separação pelo CLAE dos constituintes do analito segundo os parâmetros de especificidade e seletividade (ANVISA, 2003), e 4) da determinação da linearidade e o limite de quantificação inferior obtidos pelo método analítico CLAE/EM.

5.1.1 O espectro de massa: fragmentação das moléculas de CsA e TMX

Os espectros de massa originados da fragmentação da CsA e do TMX estão representados nas Figuras 23b e Figura 24b, respectivamente. Os resultados comprovam a aplicabilidade do EM para determinação da quantidade de CsA e TMX presente nas amostras.

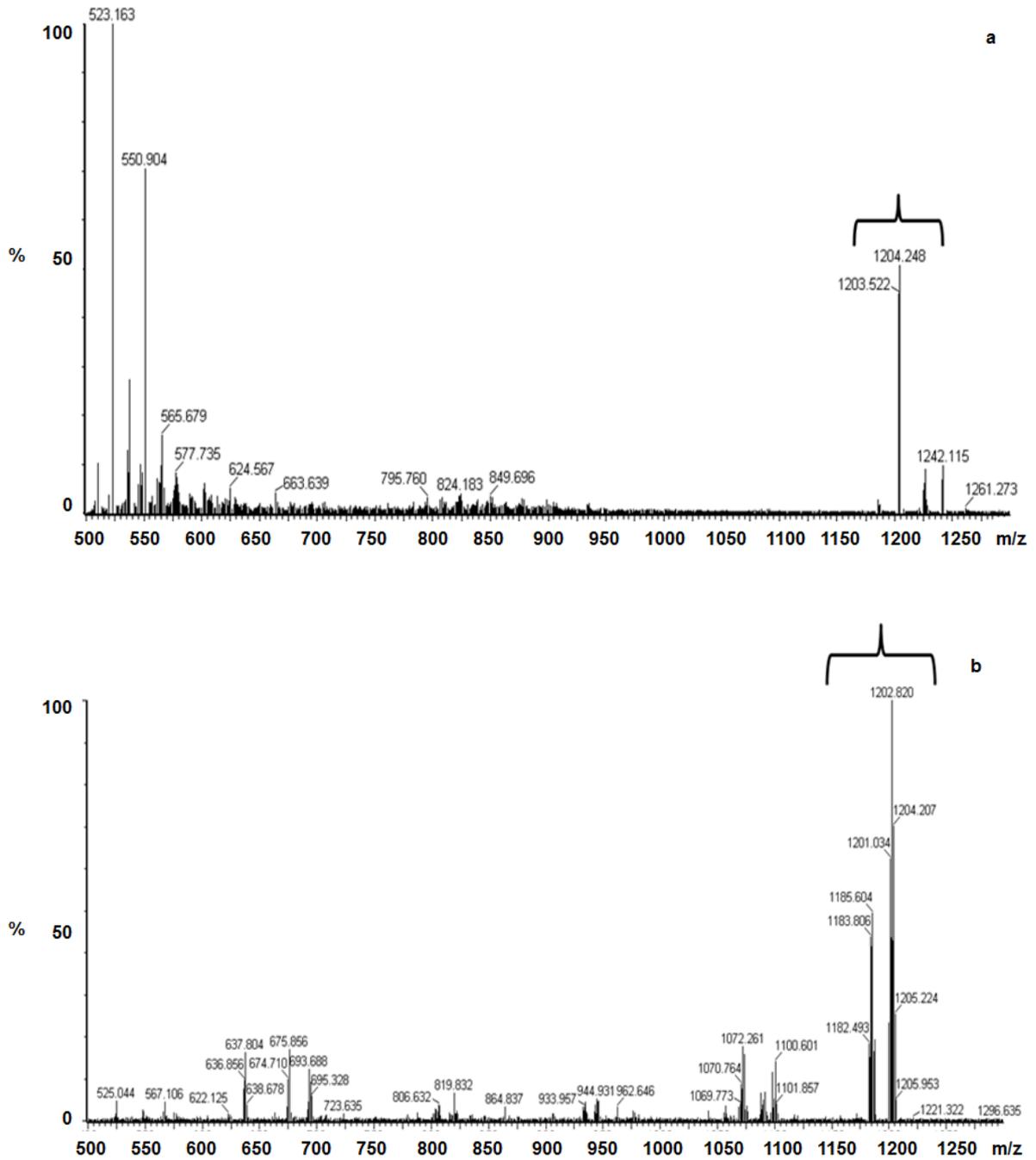


Figura 23 - Espectro de massas com fonte de eletrospray (ESI/EM): (a) da CSA, (b) dos fragmentos de CsA.

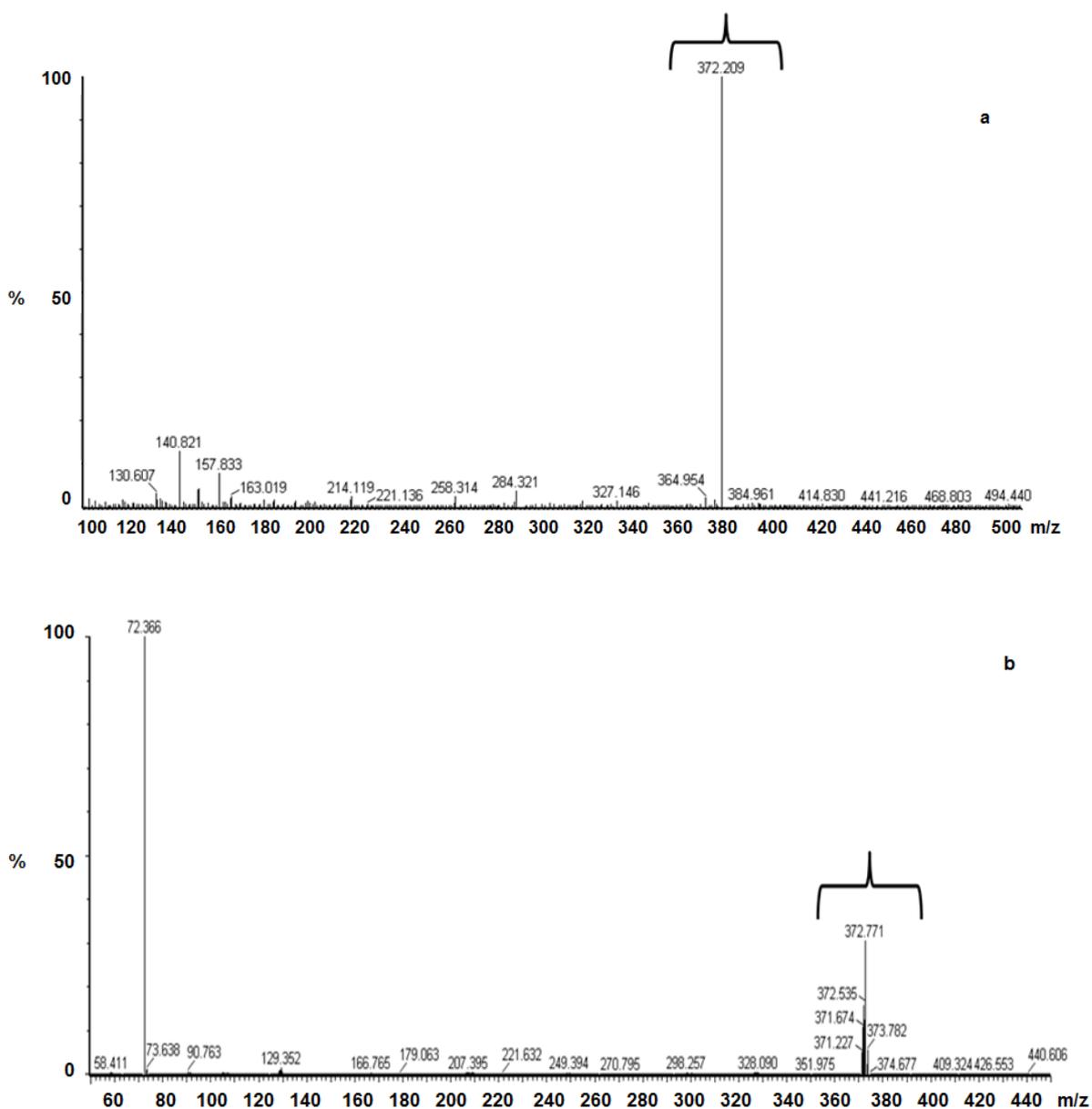


Figura 24 - Espectro de massas com fonte de eletrospray (ESI/EM): (a) do TMX, (b) dos fragmentos de TMX.

O espectro de massa identificou a CsA como molécula de massa molecular de 1204,25 g/mol (Figura 23a). Após a colisão pelo ESI, fragmentos da CsA foram encontrados com massa molecular de 1202,82 g/mol e 1185,60 g/mol (Figura 23b). Para o TMX, a molécula de massa molecular de 372,20 g/mol (Figura 24a) originou fragmentos de massa molecular de 372,77 g/mol (Figura 24b). As moléculas fragmentadas acima apresentadas foram as utilizadas para determinação da quantidade de CsA e TMX presentes no analito.

5.1.2 Determinação da eficiência do método de precipitação de proteínas: a recuperação do analito e efeito da matriz

A recuperação do analito pelo método de precipitação de proteínas foi avaliada em duas concentrações diferentes de CsA, em quadruplicata, por meio da comparação entre as áreas dos fármacos em solução na fase móvel com aquelas obtidas com amostras do vítreo submetidas ao processo de extração de proteínas, nas mesmas concentrações (Tabela 1).

TABELA 1

Resultados da recuperação do analito

Concentração (ng/mL)	Área média das amostras em fase móvel (n = 4)	Área média das amostras extraídas (n = 2)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
60	231,75	256,06	110	110
400	1612,61	1782,16	110	110

A recuperação do método foi satisfatória uma vez que a recuperação média foi de 110% (Tabela 2). O valor encontrado superior a 100% pode ser oriundo de desvios durante a análise como o próprio efeito de matriz ou erros analíticos como pesagens e diluições.

Os resultados encontrados no estudo de efeito da matriz estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2

Resultados do teste de efeito de matriz

Concentração (ng/mL)	Área média das amostras em fase móvel (n = 4)	Área média das amostras extraídas (n = 2)	Efeito Matriz (%)	Efeito Matriz Médio (%)
20	73,53	67,54	-8,2	-2,02
500	2163,58	2187,02	+1,08	
100	4150,38	4218,08	+1,06	

A partir dos resultados obtidos de efeito de matriz, foi possível demonstrar que não houve efeito de matriz significativo para a CsA, uma vez que todos os desvios obtidos ficaram dentro da faixa de ± 15 . Valores negativos de desvio indicam supressão de ionização, enquanto valores positivos indicam indução de ionização (Matuszewski et al., 2003). %. Adicionalmente, o valor de 8,2% de efeito de matriz encontrado para as amostras na diluição de 20 ng/mL foi atribuído à possíveis erros de diluição no momento de preparo das amostras.

5.1.3 Validação da metodologia de CLAE utilizada para separação dos constituintes do analito: avaliação da seletividade e especificidade

A seletividade do método foi determinada a partir da análise dos cromatogramas obtidos para o fragmento ionizado obtido para a CsA e para o TMX na presença do vítreo. A especificidade foi demonstrada pela comparação dos picos obtidos da CsA e TMX e dos constituintes do vítreo (Figura 25).

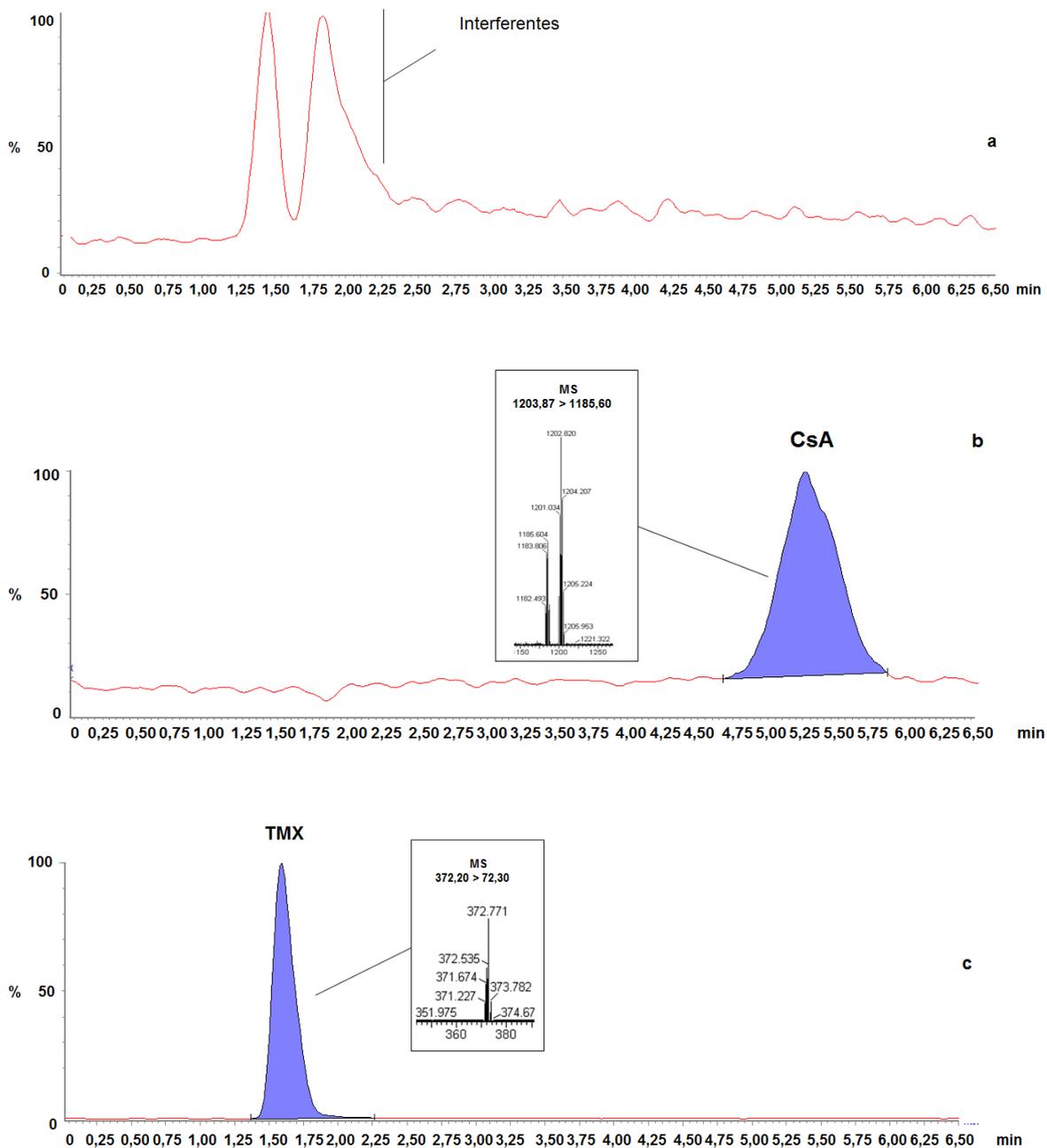


Figura 25 - Cromatograma obtido de análise por cromatografia líquida com espectrometria de massas (CLAE/EM) dos constituintes do vítreo (a), da CsA (b) e TMX (c).

O estudo dos cromatogramas indica uma boa separação da CsA dos constituintes do vítreo (Figura 25a e 25b), comprovando a seletividade do método. A especificidade é também confirmada, uma vez que os picos presentes no vítreo não interferem no pico obtido para detecção da CsA. Apesar dos interferentes do vítreo e o TMX serem eluídos simultaneamente, eles não interferem na adequada determinação do fármaco.

Apesar do tempo de eluição dos constituintes do vítreo e do TMX serem semelhantes (Figura 25a e 25c), a viabilidade da utilização da metodologia por CLAE/EM foi confirmada pelos estudos de recuperação do analito e de efeito de matriz.

5.1.4 Determinação da linearidade, exatidão, limite de quantificação inferior e sinal: ruído

A linearidade do método foi verificada para uma faixa de 20 a 1000 ng/mL para a CsA. As três curvas obtidas em dias consecutivos são mostradas na Figura 26.

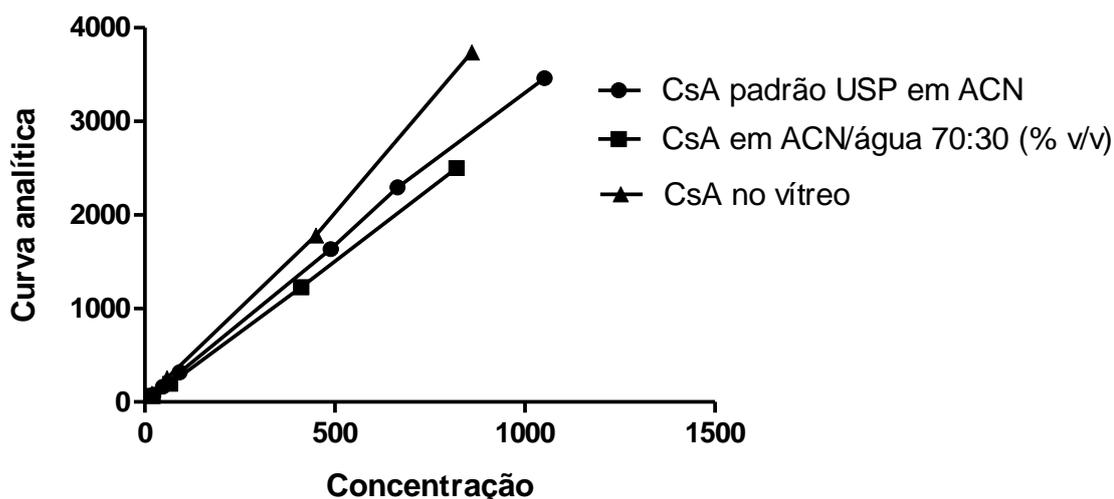


Figura 26 - Gráficos das curvas analíticas dos testes de linearidade.

A linearidade do método foi observada uma vez que a quantidade de CsA determinada nos meios contendo fase móvel e vítreo apresentaram-se proporcionais e um perfil de curva semelhante ao padrão USP foi encontrado (Figura 26). As três curvas obtiveram $R^2 > 0,98$ e todos os pontos da curva e os controles baixo, médio e alto, apresentaram desvios dentro da faixa estabelecida de 20% para o LQI e 15% para os demais com perda de não mais que dois pontos por curva, comprovando a precisão do método.

A exatidão do método foi demonstrada por meio da análise das três curvas obtidas das amostras contaminadas em água, análise em triplicata, e em vítreo, em duplicata devido ao pouco material disponível. Os testes foram realizados em dois dias consecutivos. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3
Resultados da exatidão do método

Replicatas	Concentrações			
	60 ng/mL	400 ng/mL	1000 ng/mL	
Curva 1 (CsA em água)	1	65,84	437,09	812,67
	2	67,93	407,35	818,37
	3	68,51	391,62	830,92
Curva 2 (CsA em água)	1	66,65	361,68	811,53
	2	66,70	371,05	810,25
	3	68,07	366,44	831,98
Curva 3 (CsA em vítreo)	1	62,08	412,28	860,47
	2	55,24	448,70	917,67
Média ± DPR (%)	65,13 ± 6,87	399,53 ± 8,17	836,73 ± 4,39	
Exatidão (%)	108,55	99,88	104,59	

O valor de exatidão encontrado foi entre 104,59% e 108,55% (Tabela 3), resultado válido uma vez que se apresentou dentro da faixa de variação estabelecida pela ANVISA (Brasil, 2003). Esses resultados reforçam a aplicabilidade do método desenvolvido na determinação da CsA .

O limite inferior de quantificação do método foi confirmado por meio da avaliação da relação sinal/ruído nos cromatogramas e da análise em triplicata de amostras contendo CsA em água e em duas repetições no vítreo. Os resultados são demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4

Resultados do limite de quantificação inferior do método

Replicatas	Concentração	
	20 ng/mL	
Curva 1 (CsA em água)	1	19,89
	2	21,32
	3	21,68
Curva 2 (CsA em água)	1	20,73
	2	18,87
	3	18,97
Curva 3 (CsA em vítreo)	1	18,69
	2	18,58
Média ± DPR (%)	19,84 ± 1,17	
Exatidão (%)	96.15	

Todos os valores de desvio padrão relativo foram inferiores a 20% e a exatidão se manteve dentro da faixa de 80% a 120%, demonstrando que a concentração de 20 ng/mL pode ser considerada seguramente como o limite inferior de quantificação do método.

Além disso, a relação sinal: ruído nos cromatogramas obtidos nessa concentração foi avaliada (Figura 27). A relação obtida para a CsA foi de 6, valor superior ao mínimo 5 preconizado pela ANVISA (Brasil, 2003).

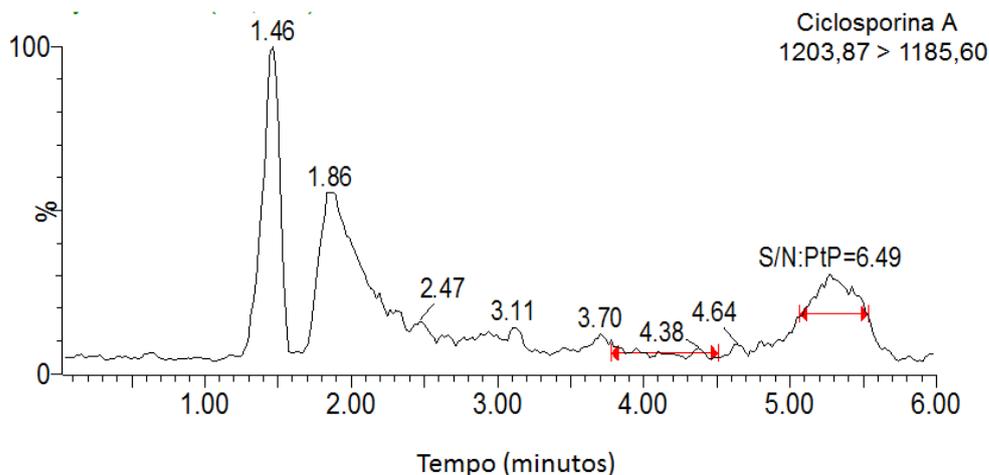


FIGURA 27 - Cromatograma demonstrativo do sinal/ruído para a concentração de 20 ng/mL de CsA.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a validação do método desenvolvido comprovou a validade dos parâmetros e a possibilidade de sua aplicação para quantificação do fármaco CsA durante os estudos de liberação *in vivo*. A Tabela 5 sintetiza os dados de validação obtidos nessa etapa.

TABELA 5

Síntese dos dados de validação

Recuperação do método	110%
Efeito da matriz	-2,02%
Método específico	Sim
Método seletivo	Sim
Linearidade em vítreo	$r^2 > 0,98$
Exatidão	99,88% a 108,55%
Limite de quantificação	19,3 ng/mL
Sinal: Ruído	6

Nessa etapa do trabalho, um método seguro e eficaz para quantificar a CsA presente nas amostras de vítreo foi desenvolvido e validado. A associação da CLAE ao detector EM (CLAE/EM) permitiu a quantificação da CsA em concentrações muito baixas, limitação existente quando o CLAE é associado ao detector de Ultra Violeta (UV).

O CLAE/EM é uma técnica que apresenta alta sensibilidade, essa superior em comparação com ao detector de Ultra Violeta (UV). Diferente do detector UV, que identifica todas as substâncias que absorvem no comprimento de onda selecionado, o EM detecta apenas a massa molecular inerente à molécula de interesse, neste caso, a CsA, esta determinada por meio da obtenção fragmentados ionizados característico da molécula originados pelo eletrospray (ESI). Ainda, essa técnica se apresenta mais seletiva e específica, já que apenas os fragmentos ionizados da molécula de interesse são determinados.

A técnica em questão consiste primeiramente na separação dos constituintes presentes no analito pelo CLAE. À medida que ocorre a separação, a fase móvel elui as substâncias em direção ao detector de massa (EM) que irá ionizá-las e fragmentá-las. O detector Espectroscopia de Massa (EM), composto por três fases, detecta primeiramente as massas moleculares das moléculas de interesse. Na segunda etapa, a molécula ionizada no estado gasoso é colidida sob uma atmosfera de vácuo e fragmentos específicos dessa molécula são formados. Por fim, o fragmento é então detectado e sua leitura é realizada e o perfil do espectro de massa é obtido. O interessante dessa técnica é a possibilidade de selecionar a massa molecular que será detectada e analisada, sendo assim uma técnica de alta seletividade. Ainda, a alta especificidade do EM é atribuída à sua capacidade de gerar fragmentos exclusivos da molécula do fármaco.

Apesar das vantagens do EM, alguns constituintes da amostra podem interferir no processo de fragmentação e originar resultados de quantificação não confiáveis, principalmente quando o electrospray (ESI) é utilizado como fonte de ionização. Neste estudo, as proteínas e sais presentes no vítreo podem ser considerados os potentes interferentes. Para tanto, a confiabilidade da determinação dos fragmentos de interesse foi garantida pela adição de uma quantidade fixa e conhecida de um padrão interno (PI) em todas as amostras a serem analisadas a fim de confirmar que nenhuma variação indesejável ocorreu durante análise.

Adicionalmente, a separação do fármaco do vítreo foi realizada objetivando a eliminação dos possíveis interferentes presentes na amostra a ser analisada.

Neste trabalho, o PI escolhido foi o tamoxifeno (TMX), um fármaco mais comercialmente disponível e de menor custo quando comparado à ciclosporina deuterada e ciclosporina D (CsD), segundo descrito por Chimalakonda et al., 2002; Taylor et al., 2005). Para separação do fármaco presente no vítreo, foi adotado o método de precipitação de proteínas, este de fácil manuseio e baixo custo.

A eficiência do método de precipitação de proteínas foi avaliada pelos estudos de recuperação do método e de efeito de matriz. A recuperação do método consistiu na contaminação do vítreo branco com uma quantidade conhecida de CsA, molécula de interesse, e do padrão interno TMX. A recuperação de 110% comprova que a CsA e o TMX foram devidamente separados dos constituintes do vítreo e determinados pelo EM, resultado que confirmam a confiabilidade na quantificação da CsA ausência já que os constituintes do vítreo não interferiram na análise (Tabela 2).

A eficiência da separação do fármaco pelo método de precipitação de proteínas foi confirmada pelo estudo do efeito da matriz. Observou-se que as quantidades de CsA encontradas nas três concentrações avaliadas na amostra contendo fase móvel foi semelhante àqueles resultados determinados nas amostras submetida ao método de precipitação de proteína. O efeito da matriz médio encontrado foi de - 2,02% o que indica que apenas 2% da CsA não sofreu ionização e consequente fragmentação pelo EM. Esse resultado reforça a afirmativa de que o método de precipitação de proteínas foi eficaz na separação da CsA do vítreo e que os interferentes ainda restante no sobrenadante analisado não interfere, de forma significativa, na determinação do fármaco.

A etapa final da validação do método proposto se tratou da avaliação dos parâmetros de seletividade, especificidade, exatidão, linearidade, limite de quantificação e sinal/ruído segundo preconizado pela ANVISA (Brasil, 2003).

A especificidade é confirmada uma vez que os picos presentes no vítreo não interferem nos picos obtidos para quantificação dos fragmentos da CsA (Figura 25a) e do TMX (Figura 25b) Acredita-se que a adequada separação é válida para minimizar o efeito da matriz e para melhorar a detecção dos fragmentos de interesse pelo EM já que o fragmento de cada constituinte presente na amostra será originado em diferentes intervalos de tempo.

A linearidade do método foi observada uma vez que a quantidade de CsA determinada nos meios contendo fase móvel e vítreo apresentaram-se proporcionais e perfil de curva semelhante ao padrão USP (Figura 26).

A exatidão do método foi realizada a fim de confirmar a capacidade da metodologia de determinar as quantidades reais de CsA presente nas amostras. A partir da área do pico encontrado para o fármaco foi realizada a quantificação deste presente no vítreo em triplicata. O valor de exatidão encontrado foi entre 104,59% e 108,55% (Tabela 4), porcentagem válida uma vez que se apresentou dentro da faixa de variação estabelecida pela ANVISA (Brasil, 2003). Esses resultados reforçam a aplicabilidade do método desenvolvido na determinação da CsA .

O propósito de quantificar a CsA em ordem de nanogramas foi atingido ao se detectar o limite de quantificação de 20 ng/mL, esse suficiente para determinar o fármaco presente na maioria das amostras do vítreo avaliados nesse trabalho. Ainda, o ruído apresentado pela linha de base não interferiu na confiabilidade dos resultados de quantificação do fármaco.

Após a obtenção, com sucesso, de um método adequado para determinação da CsA no vítreo, a etapa seguinte consistiu na determinação do perfil de liberação do fármaco no vítreo dos animais utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Este estudo foi realizado para determinar e melhor compreender os mecanismos envolvidos nesse processo.

5.2 Determinação do mecanismo de liberação da CsA no estudo *in vivo*

A determinação do mecanismo de liberação da CsA a partir dos implantes em questão se baseou na tentativa de elucidar as três etapas de liberação descritas na literatura: a etapa primária caracterizada pelo “burst” inicial, a secundária que acontece pela difusão do fármaco pela matriz porosa e intumescida e a terciária determinada pela liberação do fármaco pela matriz erodida, (Kunou et al., 1995; Kunou et al., 2000; Yasukawa et al., 2001; Lee et al., 2010), vide item 2.4.3.1.

Para tanto, a quantidade de CsA liberada no vítreo, o perfil de degradação da matriz do implante e a cinética de liberação do fármaco foram determinados nas oito semanas de estudo *in vivo*.

5.2.1 Avaliação do perfil de liberação da CsA no vítreo a partir dos implantes poliméricos em estudo *in vivo*

O perfil de liberação da CsA no vítreo foi obtido na forma de porcentagem acumulada de liberação do fármaco em relação ao tempo de estudo *in vivo* (Figura 28).

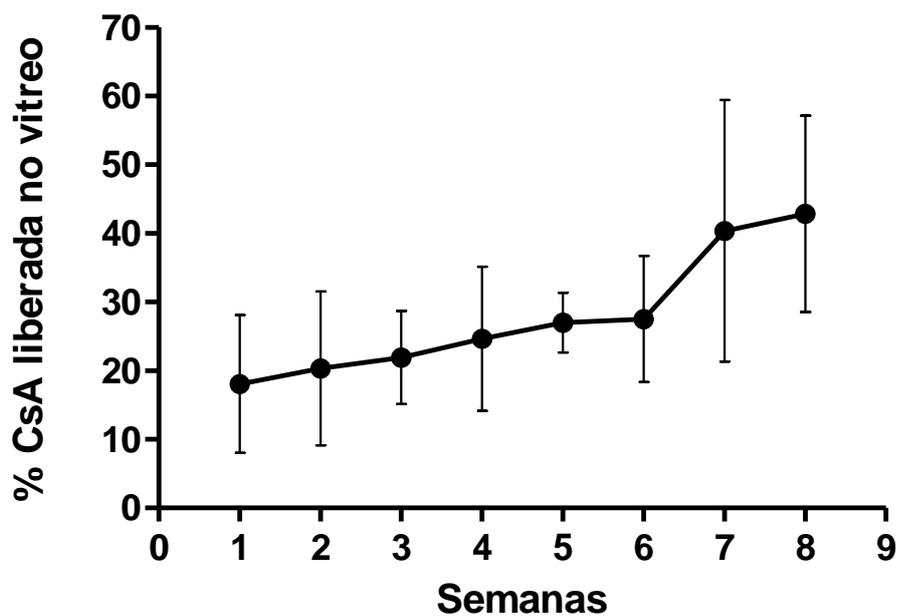


FIGURA 28 - Perfil de liberação da CsA no estudo *in vivo*.

Nessa avaliação, o valor mínimo e máximo de liberação da CsA no vítreo durante as oito semanas de experimento foram de 19,37 e 42,8%, respectivamente. Observa-se um aumento gradativo da liberação da entre as semanas 1 e 6 de 27,5% (aumento da liberação da CsA de 2,37% \pm 0,51 entre cada semana) e uma liberação acentuada de 12,83% entre as semanas 6 e 7 (27,5% a 40,4%) e pequena liberação de 2,48% entre as semanas 7 e 8 (40,4% a 42,8%).

O perfil de liberação observado na Figura 28 apresenta característica de um sistema de liberação prolongada de fármacos a partir de um implante polimérico biodegradável de PLGA (Figura 17). A primeira etapa definida pelo “burst” inicial foi observada no estudo, provavelmente devido à presença de fármaco adsorvida na superfície do sistema. Adicionalmente, a quantidade liberada de CsA durante a

primeira semana de estudo *in vivo* é superior àquela encontrada no vítreo por Dong e colaboradores (2006), quantidade capaz de suprimir a inflamação intraocular em modelos de uveíte induzida por endotoxinas (UIE). Esse resultado valida o sistema quanto à disponibilização de doses terapêuticas na fase inicial de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica do sistema.

Como etapa seguinte da avaliação do mecanismo de liberação da CsA, a degradação da matriz polimérica e a cinética de liberação foram avaliadas a fim de determinar a existência da etapa terciária e o quanto a etapa secundária interfere na liberação da CsA.

5.2.2 Determinação do perfil de degradação da matriz polimérica

A determinação da porcentagem de perda de massa polimérica do implante ao longo do teste de liberação *in vivo* foi utilizada para acompanhar o perfil de biodegradação do material (Figura 29).

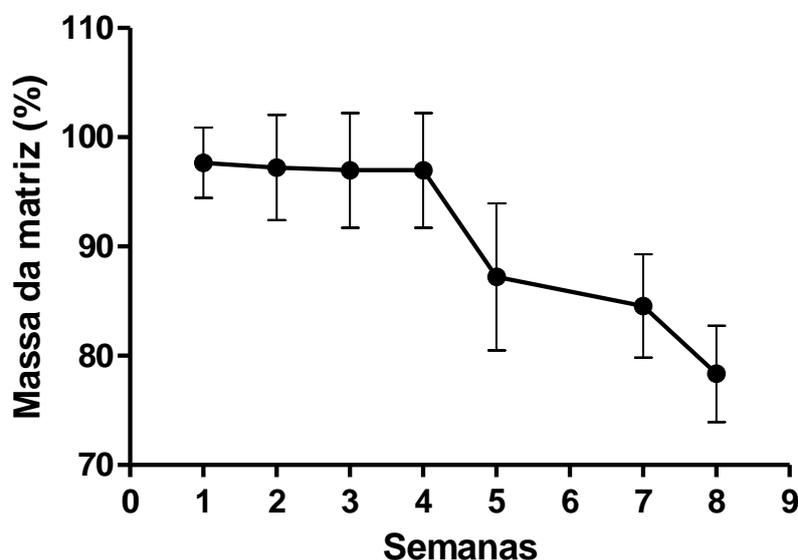


Figura 29 - Relação entre porcentagem de perda de massa polimérica *versus* o tempo de estudo *in vivo*.

No estudo *in vivo*, observa-se uma perda de massa de 22,8% durante as oito semanas analisadas. Durante as quatro primeiras semanas, foi observada uma

pequena perda de massa de 3,1%. Já nas semanas posteriores, foi constatada uma perda da matriz polimérica de 3% entre as semanas 3 e 5 e 8,1% entre as semanas 5 e 8. A partir dos resultados encontrados, sugere-se que a perda de material foi pequena, o que indica a ausência da etapa terciária nas semanas analisadas nesse trabalho.

Frente aos resultados obtidos, pode-se sugerir que a perda de massa durante o período analisado está relacionada com a formação de poros na matriz polimérica. Acredita-se que, a partir da quinta semana, ocorreu a significativa formação de poros pela água presente no vítreo, alteração que possibilitou uma maior liberação da CsA a partir da sexta semana de estudo *in vivo* (Figura 28).

Dessa forma, propõe-se que, durante o período avaliado, o processo de difusão por meio da matriz porosa seja o mecanismo primordial para liberação da CsA.

5.2.3 Avaliação da cinética de liberação *in vivo*

A influência da etapa secundária no mecanismo de liberação de fármacos observado pelo estudo *in vivo* pode ser melhor compreendido pelo estudo da cinética de liberação da CsA pelos modelos de difusão controlada de acordo com a equação de Higuchi (comportamento fickiano) e de Korsmeyer-Peppas (mecanismo não fickiano) previamente descritos no item 4.3.8.

Uma vez determinado o perfil de liberação, a equação da reta foi obtida por meio da plotagem da porcentagem liberada de CsA a partir dos implantes intraoculares para cada semana, resultados apresentados nas Figuras 30 e 31.

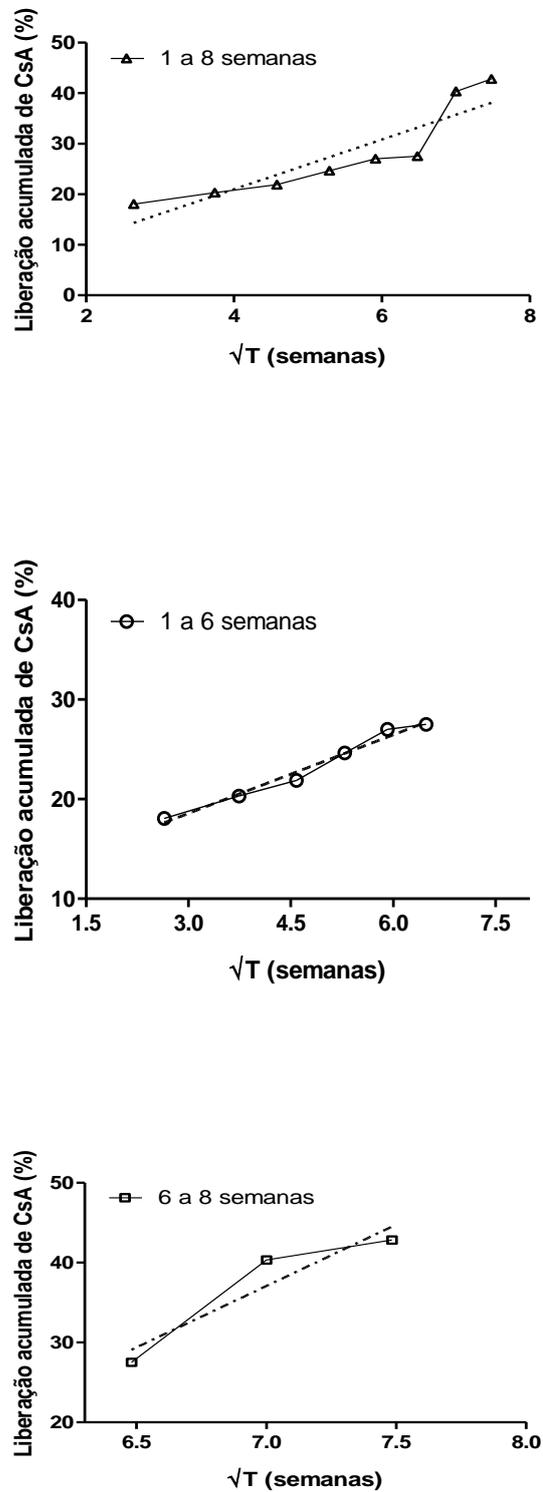


Figura 30 - Gráficos relacionando a porcentagem acumulada de CsA liberada no vítreo e o tempo no estudo *in vivo* segundo o modelo de Higuchi. A análise exponencial está representada pelas linhas pontilhadas.

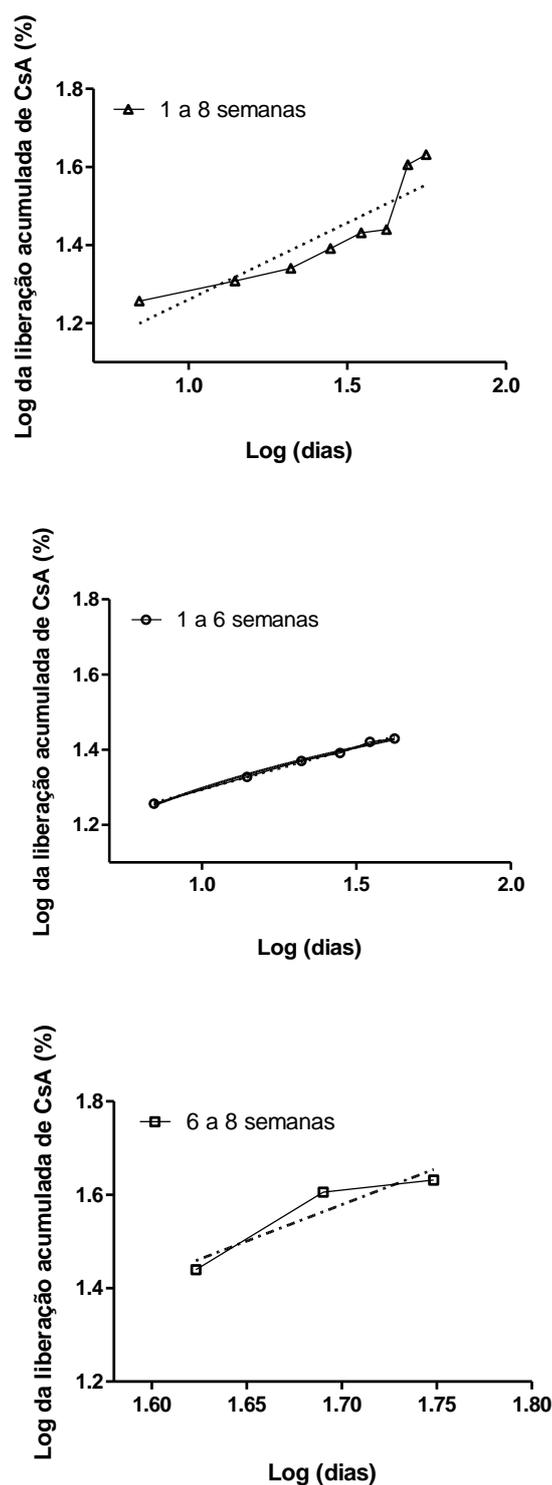


Figura 31 - Gráficos relacionando o logaritmo da porcentagem acumulada de CsA liberada e o tempo no estudo *in vivo* segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas. A análise logarítmica está representada pelas linhas pontilhadas.

As equações da reta definida pelo modelo de Higuchi e Korsmeyer-Peppas e os valores do coeficiente de correlação e da inclinação da reta (n) encontrados nos estudos *in vitro* e *in vivo* estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

TABELA 6

Resultados obtidos pelo modelo matemático de Higuch descrito por Kunou e colaboradores (1998)

Semanas		1-8 semanas	1-6 semanas	6-8 semanas
<i>Estudo in vivo</i>	R ²	0,806	0,977	0,882
Equação				
F = K _H .t ^{1/2}		y = 10,378e ^{0,1749x}	y = 13,182e ^{0,1163x}	y = 1,6182e ^{0,4449x}

TABELA 7

Resultados obtidos pelo modelo matemático de Korsmeyer - Peppas descrito por Nochos e colaboradores (2008)

Semanas		1-8 semanas	1-6 semanas	6-8 semanas
<i>Estudo in vivo</i>	R ²	0,801	0,994	0,878
Equação				
Mt/M [∞] = kt ⁿ		y = 0,4699ln(x) + 1,2718	y = 0,9183ln(x) + 1,3017	y = 1,8306ln(x) + 0,6108
	n	_____	0,918	_____

Segundo o modelo de Higuchi, uma relação não linear foi observada para os estudos *in vivo* uma vez que as curvas obtidas apresentaram um coeficiente de correlação inferior a 0,99. Esse modelo matemático foi considerado inadequado para representar a etapa secundária nas oito semanas avaliadas.

Já pelo modelo de Korsmeyer - Peppas, coeficientes de correlação (r²) acima de 0,99 foram encontrados durante apenas as seis primeiras semanas. Não foi observado uma relação matemática entre seis e oito semanas no estudo *in vivo*

devido à ocorrência de uma maior perda de massa matricial entre as semanas 6 e 7, sendo impossível obter a relação matemática e análise deste período. Adicionalmente, não foi possível avaliar o período superior a sete semanas, uma vez que é necessário o número mínimo de três pontos para obtenção de uma relação matemática

O valor observado de r^2 permite afirmar que o período analisado pode ser avaliado pelo modelo de Korsmeyer – Peppas que afirma que o mecanismo de liberação acontece primordialmente pela difusão do fármaco pela matriz polimérica e assume um comportamento anômalo, ou seja, não representado pelo modelo de Higuchi.

Adicionalmente, nas primeiras seis semanas, observa-se que o valor de n (inclinação da reta que determina o tipo de difusão ocorrido) foi de 0,918. Esse valor retrata uma liberação da CsA regida pelo transporte fickiano de zero ordem. Isso significa que a quantidade de fármaco liberado acontece de forma independente da concentração inicial (C_0) do fármaco presente na matriz polimérica (Siepmann et al., 2008) e que a matriz polimérica pouco interfere na liberação da CsA.

O valor de n também indica que a liberação da CsA ocorre pela difusão do fármaco da matriz intumescida e porosa determinada pela etapa secundária (Quadro 6). Pode-se sugerir que a liberação esteja relacionada primeiramente com o intumescimento da matriz polimérica e formação de poros, seguido da difusão do fármaco pela matriz. O intumescimento ou inchamento ocorre quando a água presente no vítreo penetra no sistema pela superfície da matriz polimérica hidrofílica. Esse processo possibilita a difusão da CsA pelos espaços aquosos originados entre as cadeias poliméricas da matriz. O contato da água com a superfície da matriz também desencadeia pequenas hidrólises poliméricas e formação de poros que facilitam a difusão da CsA.

A escolha de apenas dois modelos matemáticos para a avaliação da cinética de liberação da CsA no vítreo foi baseada no trabalho científico publicado por Siepmann e colaboradores (2008). Segundo esses autores, o modelo de Higuchi e Korsmeyer - Peppas são modelos que melhor representam o perfil de liberação de fármacos a partir de um sistema monolítico, cilíndrico e na fase inicial de liberação (perda de massa não significativa). Modelos como Hopfenderg e Cooney não são os mais adequados para análise do sistema em questão, pois são capazes de

descrever quantitativamente sistemas cuja liberação é determinada pela degradação da matriz polimérica dependente do tempo (modelo de Hopfenderg) e dependente da matriz erodida (modelo de Cooney).

É importante ressaltar que o experimento foi inicialmente planejado de acordo com o protocolo escrito por e Cunha (2006). Nesse trabalho, um implante à base do copolímero do ácido lático e glicólico contendo dexametasona foi analisado por oito semanas, o qual foi capaz de liberar todo o fármaco incorporado, diferentemente do encontrado neste trabalho no qual apenas 42,8% do total de CsA foi liberado. Consequentemente, o tempo planejado para o experimento foi insuficiente para determinar as três etapas de liberação da CsA a partir do implante desenvolvido.

A fim de melhor compreender o mecanismo de liberação por meio da avaliação da fase terciária e melhor aplicar os métodos matemáticos descritos, será necessário efetuar o perfil de liberação por completo (Siepmann et al., 2008), uma vez que o estudo é considerado finalizado apenas quando a liberação do fármaco é totalizada. Para tanto, propõe-se como uma das perspectivas desse trabalho, dar continuidade tanto ao estudo de liberação *in vivo*, objetivando a obtenção futura dos perfis de liberação, no sentido de se complementar o estudo apresentado nesse trabalho.

Frente aos resultados encontrados, pode-se afirmar que a liberação da CsA no vítreo a partir do implante é característico de um sistema de liberação prolongada (SLP). A etapa secundária do perfil de liberação ocorreu cujo mecanismo primordial de liberação é determinado pela difusão do fármaco pela matriz polimérica intumescida e porosa. Acredita-se que o fármaco será totalmente disponibilizado no vítreo após dezessete semanas antes da erosão significativa da matriz, já que apenas 42,8% do fármaco foi liberado e 22,8% da matriz foi degradada em oito semanas. Frente à proposta de liberação da CsA pela matriz pouco erodida, acredita-se que não ocorrerá o “burst” tardio e repentino e disponibilização da CsA no vítreo em quantidade potencialmente tóxica.

Adicionalmente, conclui-se que o meio em que o implante se encontra inserido também interfere no perfil de liberação da CsA. No estudo *in vitro* em tampão salina realizado por Saliba e colaboradores (2008, vide anexo), o mesmo perfil de liberação do fármaco e degradação da matriz foram observados, porém uma taxa mais lenta de liberação e degradação foram encontrados. A perda de

massa polimérica do implante foi de 0,03% durante as treze primeiras semanas. Após este período, o implante perde massa polimérica até o valor de 0,5% durante as 23 semanas observadas. Acredita-se que os constituintes do humor vítreo (água e proteínas) tenham exercido uma importante influência na formação de poros e intumescimento da matriz, facilitando a solubilização do fármaco. Ainda, acredita-se também que o vítreo de olhos inflamados podem interferir no perfil de liberação da CsA e degradação da matriz do implante. Para tanto, é de extrema importância a realização de novos estudos de liberação *in vivo* a fim de determinar o mecanismo liberação da CsA a partir do implante em olhos que apresentam inflamação intraocular.

Após determinação do mecanismo de liberação da CsA a partir da matriz polimérica, a etapa seguinte desse trabalho consistiu na determinação do período de permanência do fármaco no vítreo a fim de avaliar a viabilidade de utilização do sistema como uma alternativa para tratar a uveíte resistente à terapia com corticoide.

5.3 Determinação do período de permanência da CsA no vítreo: estudo da farmacocinética *in vivo*

A avaliação do perfil farmacocinético da CsA liberada do estudo *in vivo* foi realizada objetivando uma melhor compreensão do perfil de eliminação e período de permanência do fármaco na cavidade vítrea. Essas informações são essenciais para determinação de uma estratégia de tratamento de doenças inflamatórias intraoculares. Nesse trabalho, foi estipulado o tempo total de permanência da CsA no vítreo a partir dos valores experimentais obtidos para as sete semanas de estudo *in vivo*. Esses resultados nos permitem avaliar se a utilização desse sistema é válida para tratamento de uma uveíte posterior resistente à terapia com corticoides cujo tratamento é caracterizado pela administração contínua e prolongada do fármaco.

Compreende-se que os parâmetros farmacocinéticos de eliminação e tempo de meia vida do fármaco na cavidade ocular partindo da inserção de um sistema de liberação prolongada são definidos pela quantidade de fármaco liberada em um determinado tempo ($C_{(0)}$) e pela quantidade de fármaco eliminado neste mesmo período ($T_{(t)}$), sendo que a quantidade em nanogramas de CsA remanescente a cada período de tempo pode ser quantificada (Figura 32).

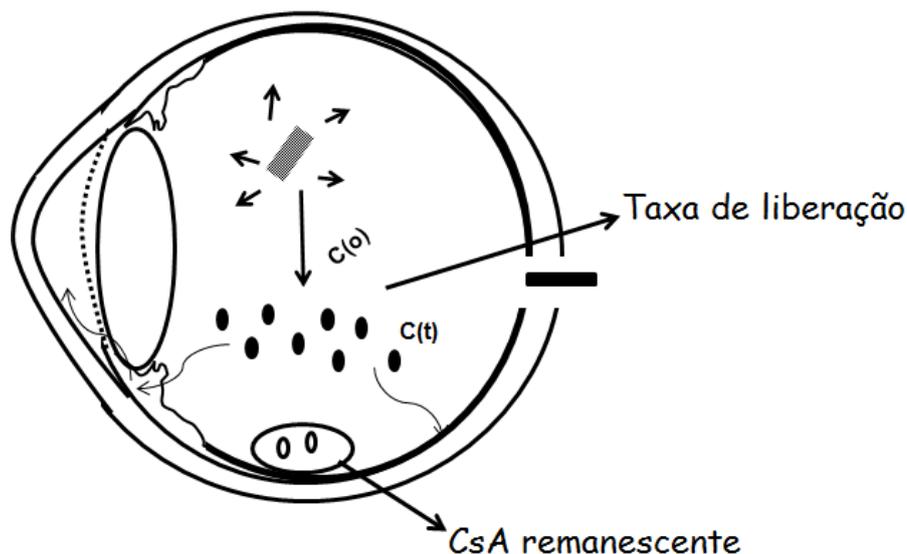


Figura 32 - Esquema ilustrativo dos parâmetros farmacocinéticos da CsA a partir do implante intraocular. Em um determinado tempo (t), certa quantidade de CsA é liberada ($C(0)$), difunde para retina, humor aquoso, íris ou copo ciliar e é eliminada ($C(t)$) pela barreira hemato-aquosa e hematorretiniana (Hornof et al., 2005) até atingir uma concentração remanescente na ordem de nanogramas. Este processo é contínuo até total liberação do fármaco presente no sistema.

O conhecimento tanto da quantidade de CsA inicial e restante no implante quanto da quantidade presente no vítreo nos permite determinar experimentalmente a taxa de eliminação do fármaco por dia, a constante de eliminação (k), o tempo de meia vida do fármaco ($t_{1/2}$). A análise desses parâmetros farmacocinéticos nos fornece o período estimado em que ocorre a liberação completa do fármaco presente na matriz polimérica e o tempo necessário para a sua total eliminação, sendo assim possível prever o tempo de permanência total do fármaco na cavidade vítrea após completa liberação da CsA do implante.

A quantidade de CsA remanescente determinada no vítreo pelo método validado CLAE/EM (item 4.3.1) durante as sete semanas analisadas e a porcentagem de eliminação determinado para todos os períodos de estudo *in vivo* estão representados nas Figuras 33 e 34.

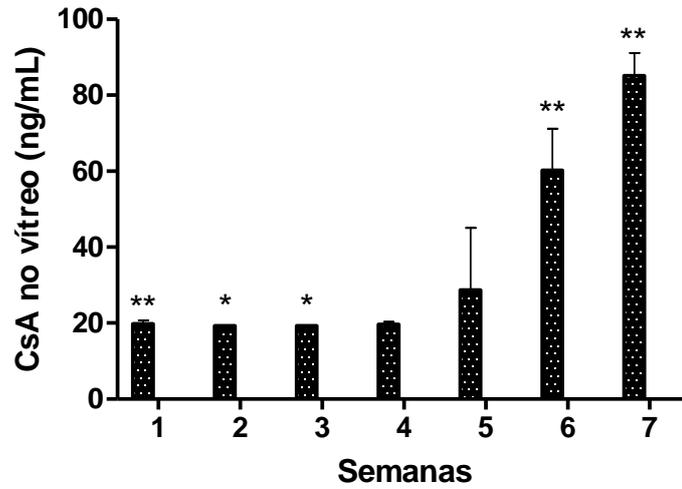


Figura 33 - Estimativa da quantidade de CsA presente no vítreo (n=3). Os valores representam à média e desvio padrão de quatro determinações. (*) concentração máxima de 19,3 ng/mL de CsA no vítreo. (**) diferença estatística obtida pelo método paramétrico One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey ($p < 0,05$).

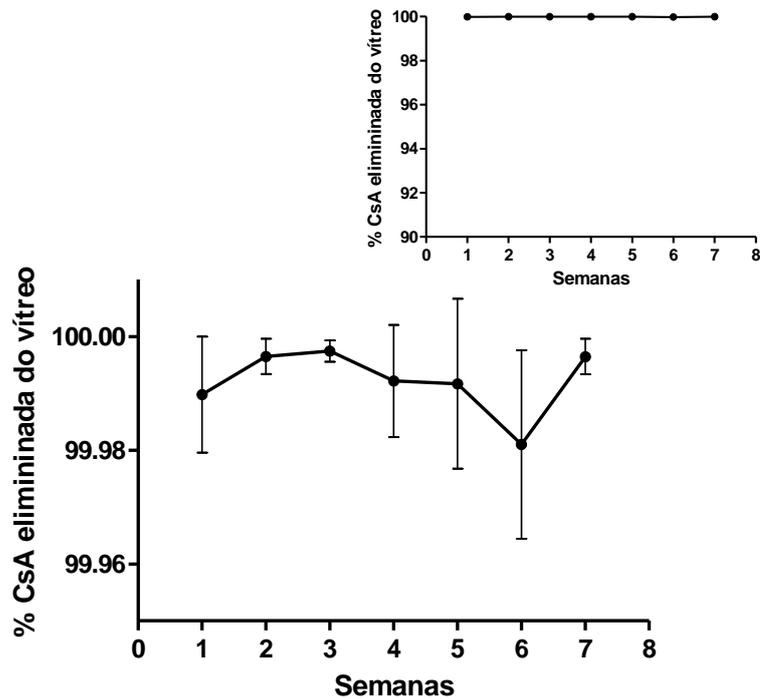


Figura 34 - Perfil farmacocinético durante sete semanas de estudo *in vivo*: porcentagem de eliminação vítrea da CsA. Os valores representam a média e desvio padrão de quatro determinações.

Uma faixa de liberação constante foi determinada entre as semanas 1 e 4, considerando a concentração de 19,3 ng/mL nas semanas 2 e 3. Nas quatro semanas seguintes, foi detectada uma liberação acentuada de CsA (de 19,67 ng/mL para 85,13 ng/mL), um aumento na taxa de liberação da CsA de 68,23% entre as semanas 4 e 5, 47,0% entre as semanas 5 e 6 e 70,72% entre as semanas 6 e 7 (Figura 33, Tabela 8). Observa-se que a quantidade de CsA aumenta significativamente após a quarta semana de liberação, resultados semelhantes àqueles obtidos nos estudos *in vivo* de perda de massa polimérica e liberação da CsA a partir dos implantes intraoculares, onde se detectou, após a quarta semana, certa perda de massa e significativa liberação de fármaco da matriz polimérica (Figuras 28 e 29). A permanência de nanogramas de CsA no vítreo durante as sete semanas avaliadas indica que a maior parte do fármaco liberado do implante é eliminado. Essa afirmativa foi confirmada ao observar a porcentagem mínima e máxima de eliminação de 99,94% e 99,97%, respectivamente (Figura 34). Adicionalmente, pode-se afirmar que a quantidade de CsA eliminada e distribuída no organismo é consideravelmente inferior à dose máxima administrada por via sistêmica de 10mg/Kg/dia (Donnenfeld et al., 2008).

Já os parâmetros farmacocinéticos (taxa de eliminação, K e $t_{1/2}$) são apresentados nas tabelas 8 e 9.

TABELA 8

Parâmetros farmacocinéticos da CsA no estudo *in vivo*: taxa de eliminação da CsA

Semanas	CsA no vítreo (ng)* n= 4	CsA liberada (C _(t)) no vítreo (µg)* Média ± DP	% de CsA eliminada
1	47,552 ± 0,735	27,429 ± 8,189	99,989
2	46,320± 0,00**	59,776 ± 9,152	99,996
3	46,320± 0,00**	77,239± 5,503	99,998
4	47,200 ± 0,518	86,926± 7,421	99,992
5	111,66± 13,331	95,217± 3,559	99,9693
6	144,560 ± 8,981	97,084 ± 7,514	99,947
7	204,320 ± 4,904	142,325 ± 13,465	99,9964

Semanas	Taxa de eliminação de CsA (µg)	Taxa de eliminação (C _(t)) de CsA (µg / dia)	Taxa de eliminação de CsA (µg / dia) Média ± DP
1	27,425	3,917	3,287 ± 0,668
2	59,773	4,269	
3	77,238	3,768	
4	86,920	3,211	
5	95,325	2,630	
6	97,033	2,310	
7	142,320	2,904	

*CsA liberada em 2,4 mL de vítreo.

**Valor estimado: concentração de CsA abaixo do limite de quantificação definida pelo método analítico HPLC/EM (19,3 ng/mL).

Como mostrado na Tabela 8, um valor único de eliminação do fármaco foi encontrado de, aproximadamente, três µg por dia. Esse resultado permite concluir que a CsA é igualmente eliminada ao longo do estudo e que este processo é

independente tanto da quantidade do fármaco liberado quanto das alterações da matriz, sendo esta a possível justificativa para o aumento gradual da quantidade de CsA remanescente no vítreo (Figura 34, Tabela 8).

Adicionalmente, foi observado que, durante as sete semanas analisadas, a quantidade de CsA eliminada é próxima à quantidade de fármaco liberada do implante. Isso significa que a sua taxa de liberação do implante é semelhante à taxa de eliminação do vítreo.

Considerando que a quantidade total de CsA presente no implante seja de $353 \mu\text{g} \pm 0,03$ ($n = 32$ implantes) e a taxa de eliminação e liberação de $3 \mu\text{g}$ por dia, acredita-se que a total liberação da CsA na cavidade vítrea ocorrerá aproximadamente após dezessete semanas.

Uma vez determinado o perfil de eliminação, as equações da reta foram posteriormente obtidas por meio da plotagem da quantidade restante no vítreo (equação 7, item 4.4.2) para cada semana a fim de determinar a constante de eliminação (K) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), resultados representados na Figura 35 e Tabela 9.

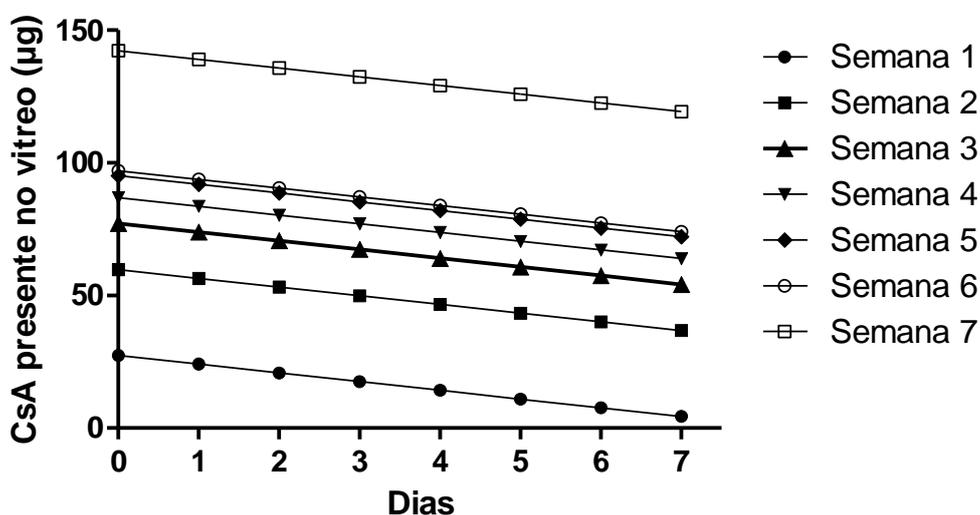


Figura 35 - Gráfico relacionando a estimativa da concentração de CsA presente no vitreo $C(t)$ e o tempo de estudo *in vivo* em dias para cada semana. Valores obtidos por meio da taxa de eliminação de $3 \mu\text{g}/\text{dia}$ determinada experimentalmente. A análise exponencial está representada pela linha sólida.

As curvas obtidas a partir de $(C_{(0)})$ e o tempo de liberação (dias) apresentaram valores de coeficientes de correlação acima de 0,99 para seis das sete semanas analisadas (Figura 35).

TABELA 9

Parâmetros farmacocinéticos da CsA no estudo *in vivo*: constante de eliminação e tempo de meia vida do fármaco

Semanas	Equação da reta ($C_{(t)} = C_{(0)} \exp^{-kt}$)	r^2	Constante de eliminação em semanas (k)	Tempo de meia vida de eliminação em dias ($t_{1/2}$)
1	$y = 32,523 \exp^{-0,245x}$	0,936	0,245	2,829
2	$y = 60,718 \exp^{-0,069x}$	0,995	0,069	10,043
3	$y = 77,896 \exp^{-0,05x}$	0,998	0,050	13,860
4	$y = 87,488 \exp^{-0,044x}$	0,998	0,044	15,750
5	$y = 95,717 \exp^{-0,039x}$	0,998	0,039	17,769
6	$y = 97,572 \exp^{-0,039x}$	0,999	0,039	17,769
7	$y = 142,63 \exp^{-0,025x}$	0,999	0,025	27,720
17*	$y = 352,77 \exp^{-0,01x}$	0,999	0,01	69,300

* Valor estimado considerando liberação total da CsA presente no implante: $C(0) = 353 \mu\text{g} \pm 0,03$.

Como mostrados na Tabela 9, foram encontrados valores crescentes de k e ($t_{1/2}$) para maiores valores de $(C_{(0)})$. Segundo a literatura, o tempo de eliminação do fármaco depende da dose inicial administrada. Quanto maior a quantidade inicial do fármaco, maior será o tempo necessário para a sua total eliminação (Siepmann et al., 2008; Kim et al., 2006). Em um sistema polimérico de liberação prolongada, a liberação do fármaco varia a cada intervalo de tempo e a quantidade inicial é

interpretada como sendo a quantidade do fármaco liberada ($C_{(0)}$) no meio exterior, no presente estudo representado pelo humor vítreo (Figura 32).

A fim de prever o tempo total de permanência da CsA na cavidade vítrea após completa liberação do fármaco da matriz polimérica, um novo valor teórico de K e $t_{1/2}$ foi determinado. Para tanto, foram considerados como ($C_{(0)}$) 353 μg de CsA \pm 0,03 ($n = 32$ implantes) e como tempo as dezessete semanas (o período total necessário para liberação da CsA). O tempo de meia vida encontrado foi de 69,3 dias, sendo assim necessários dezessete semanas para completa eliminação da quantidade total de CsA presente nos implantes avaliados. O resultado é semelhante àquele previsto pela análise do perfil e liberação *in vivo* (Figura 28) e àquele obtido pela avaliação do perfil de eliminação (Tabela 8). É importante ressaltar que esse resultado é um valor estimado já que não é conhecido experimentalmente o perfil de liberação da CsA após oito semanas de estudo.

A determinação do mecanismo de liberação da CsA a partir da matriz polimérica e a definição do perfil de eliminação do fármaco presente no vítreo permitem definir os fatores que determinam os dezessete semanas de permanência da CsA na cavidade vítrea. Acredita-se que esse período é dependente tanto das características intrínsecas da matriz polimérica do implante quanto do mecanismo fisiológico de eliminação do fármaco. Propõe-se que no primeiro momento, a CsA difunde pela matriz polimérica intumescida e não erodida através dos poros originados pela água e sais minerais presentes no vítreo. A molécula do fármaco ali presente é então eliminada em uma taxa constante pelo humor aquoso e pela barreira hematorretiniana. Próximo às dezessete semanas de liberação, toda a CsA presente no implante terá sido liberada e eliminada.

O perfil farmacocinético determinado neste trabalho foi desenvolvido utilizando animais saudáveis com olhos normais. Para tanto, novos estudos devem ser realizados a fim de determinar o perfil farmacocinético em olhos de coelhos inflamados.

Frente ao exposto, pode-se afirmar que a CsA disponibilizada a partir do implante avaliado permanece no vítreo por aproximadamente dezessete semanas, resultado que viabiliza a utilização desse sistema no tratamento da uveíte posterior resistente à terapia com corticoides.

A fim de assegurar a possibilidade de utilização futura do sistema, a etapa seguinte desse trabalho consistiu em avaliar a segurança da utilização do implante intraocular por meio dos estudos de biocompatibilidade e toxicidade *in vivo*.

5.4 Avaliação da segurança da utilização do implante intraocular em olhos de coelhos

A viabilidade da utilização do implante intraocular foi investigada por meio de estudos pré-clínicos, da avaliação histopatológica e da função retiniana nos olhos de coelhos.

5.4.1 Estudos pré-clínicos: exame biomicroscópico

O sucesso na inserção dos implantes na cavidade vítrea foi comprovado por meio da avaliação clínica dos olhos dos animais durante e após oito semanas de estudo. Os olhos dos coelhos contendo o implante com e sem fármaco apresentaram semelhantes resultados quando comparados aos olhos utilizados como controle e nenhuma alteração na biomicroscopia foi observada (Figura 36).



Figura 36 - Fotografia do implante devidamente inserido na cavidade vítrea no olho do coelho. Observa-se a ausência aparente de danos à estrutura ocular.

Nesse estudo foi possível observar que os implantes se encontraram suspensos na porção anterior do humor vítreo próximo ao local de inserção, o que comprova a sua pequena mobilidade na cavidade vítrea. Os tecidos da córnea e

conjuntiva se apresentaram normais e transparentes. Não foram detectados processos inflamatórios uma vez que células nas câmaras anterior e posterior não foram observadas. Além disso, a pressão intraocular (PIO) foi estável durante todo o estudo. Finalmente, a análise de fundo de olho mostrou ausência de opacidade vítrea, deslocamento da retina, dilatação dos vasos retinianos e neovascularização.

5.4.2 Avaliação do efeito tóxico da CsA na estrutura da retina: estudo histopatológico

A ausência da toxicidade relatada ao uso do implante observada durante os estudos pré-clínicos foi confirmada pela avaliação da estrutura e da organização do tecido da retina após oito semanas de estudo (Figura 37).

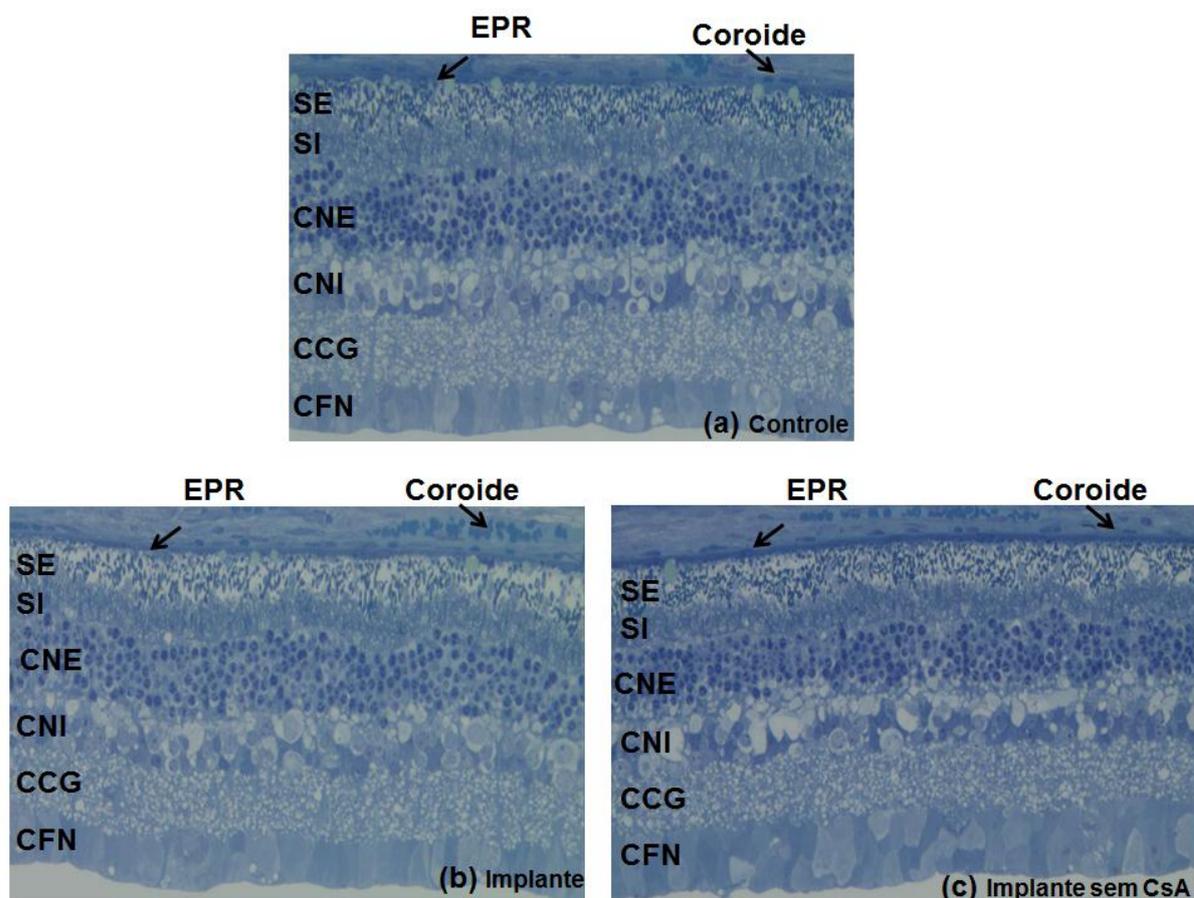


Figura 37 - Análise histopatológica da retina e coroide de olho de coelho oito semanas após a implantação do implante polimérico com (b) e sem a CsA. (c) e o controle (a). Aumento de 20X.

A morfologia normal da retina foi preservada nos olhos dos coelhos que receberam os implantes intraoculares contendo ou não o fármaco. A organização

das camadas da retina é semelhante à observada nos olhos que não receberam o sistema (controle). Adicionalmente, não foi observado nenhum sinal de necrose, fibrose ou infiltração de células inflamatórias neste tecido.

5.4.3 Avaliação do efeito tóxico da CsA na função retiniana por ERG

Independente da via de administração ou da forma farmacêutica, o efeito tóxico de diferentes fármacos nos tecidos oculares, em especial às células neuronais da retina, é de conhecimento científico e extensamente relatado em diversos trabalhos na literatura (Yasukama et al., 2001; Thaler et al., 2008; Messias et al., 2008). Alterações nas amplitudes das ondas A e B são comumente detectadas pelo eletrorretinograma (ERG) no escotópico (adaptação ao escuro) mesmo não observado nenhuma toxicidade celular ou efeito na organização dos tecidos intraoculares quando o ganciclovir (Yasukama et al., 2001), betametasona (Kato et al., 2004), rodamina 6G (Thaler et al., 2008), fluoroquinolona e pradofloxania (Messias et al., 2008) e ciclosporina A (Pearson et al., 1996; Jaffe et al., 1998; Gilger et al., 2000; Dong et al., 2006) são disponibilizados na cavidade vítrea. No caso da CsA, se encontra na literatura a descrição de alterações da amplitude das ondas B, inconveniente que pode estar relacionado com a quantidade de fármaco presente no vítreo e que a retirada do sistema é capaz de reverter este quadro (Jaffe et al., 1998; Dong et al., 2006; Pearson et al., 1996). A fim de detectar se a quantidade de fármaco liberada no vítreo é capaz de interferir no processo de foto-transdução, a função retiniana foi avaliada pela técnica de ERG no escotópico ao determinar a amplitude das ondas A e B originadas após o estímulo elétrico externo nos olhos controle e naqueles que receberam o implante contendo ou não o fármaco (Figura 38).

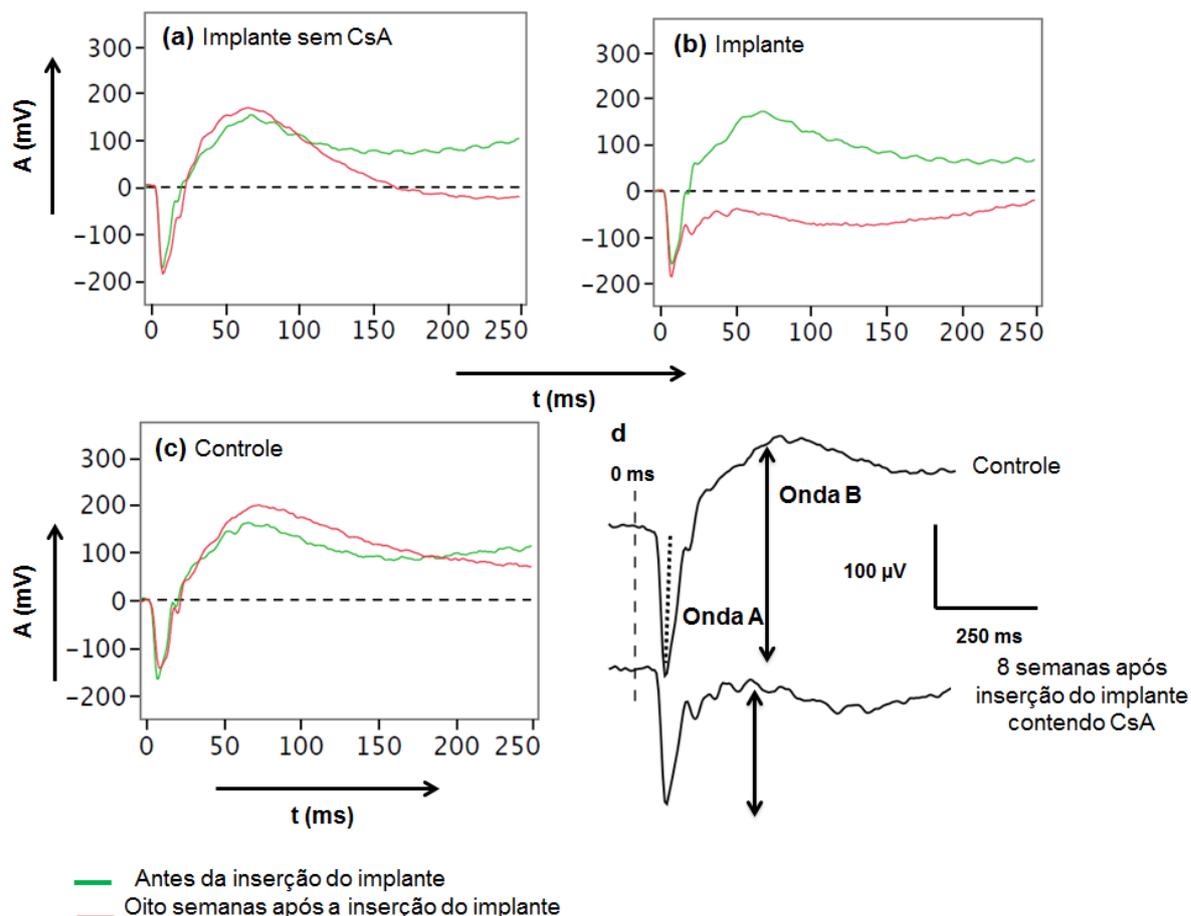


FIGURA 38 - Exemplos de respostas obtidas do ERG na luminância de 30 CD.s/m^2 após adaptação no escuro. (a) olhos esquerdos (OE) de coelhos que receberam o implante sem CsA (b) OE de coelhos que receberam o implante e fármaco. (c) olhos direitos (OD) que não receberam o sistema (controle). (d) esquema descrevendo a diminuição da amplitude da onda B nos olhos contendo o implante e CsA.

Os resultados do ERG encontrados após oito semanas de estudo mostraram sinais de toxicidade retiniana e a CsA foi considerada a responsável por essa alteração. Em relação ao olho controle (Figura 38c), as amplitudes das ondas A e B permaneceram normais nos olhos que receberam apenas a matriz polimérica (Figura 38a) e a redução na amplitude da onda B a valores negativos foi apenas observada naqueles que receberam o implante contendo a CsA (Figura 38b). Esta alteração está relacionada com a modificação na via dos bastonetes responsável pela transmissão de impulsos elétricos às células bipolares e pela capacidade de formação de imagens em ambientes com pouca iluminação (penumbra).

Uma vez que o implante foi inserido via região da *pars plana*, sugere-se que a retina periférica foi a mais afetada pelo fármaco já que o sistema se encontra

suspensão no vítreo próximo ao local de inserção, não tendo contato direto com a retina posterior.

A ocorrência da toxicidade funcional observada pela alteração da amplitude da onda B é atribuída à concentração de CsA presente na cavidade vítrea no período avaliado. Como descrito na Tabela 8, item 5.3, a concentração de fármaco no vítreo é de aproximadamente 54 µg/mL (140 µg de fármaco em 2,4 mL de vítreo), valor nove vezes superior à concentração máxima não tóxica descrita na literatura (Pearson et al., 1996; Jaffe et al., 1998; Dong; Hare., 2000).

É possível que essa alteração na função retiniana possa ser revertida após alguns dias da total eliminação da CsA presente na cavidade vítrea. Essa hipótese pode ser afirmada a partir da observação do reestabelecimento da amplitude normal das ondas B em olhos de coelhos que receberam injeção intraocular de 35 µg de CsA (Sandimmun Neoral®, 100 mg/mL, solução oral), dose trinta e cinco vezes maior que a encontrada na cavidade vítrea a partir quando administração da dose máxima do fármaco (Lafferty e Hodgkin, 1983; BenEzra et al., 1990), resultados apresentados na Figura 39.

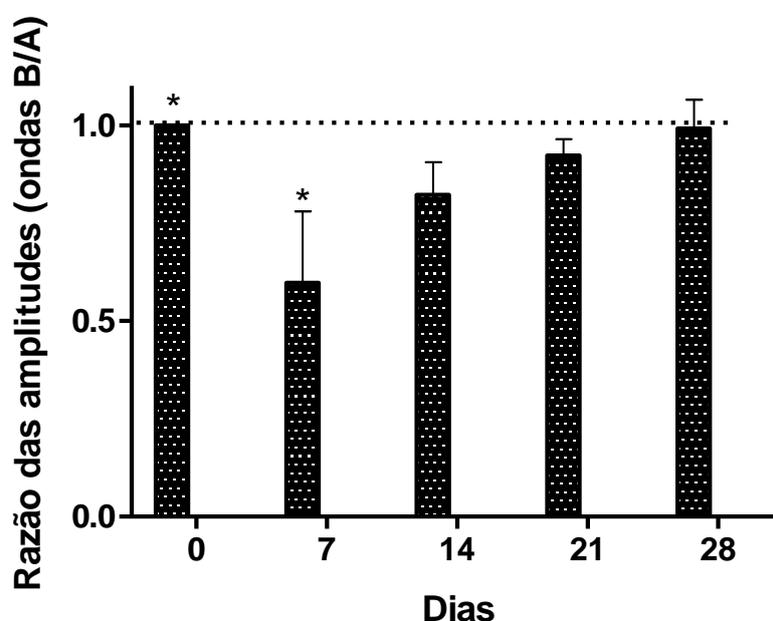


FIGURA 39 - Avaliação do período de reestabelecimento da normalidade da amplitude de onda B quando 35 µg de CsA são injetados na cavidade vítrea. (*) diferença estatística obtida pelo método paramétrico One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey ($p < 0,5$).

Na Figura 39 se observa uma supressão significativa da amplitude da onda B apenas nos primeiros sete dias de estudo. Nas semanas seguintes, a supressão é revertida de forma gradativa até total reestabelecimento da amplitude da onda B que ocorreu em quatorze dias. Acredita-se que a sua completa reversão aconteceu aproximadamente dezessete dias após a total eliminação do fármaco, já que são necessários onze dias completos para total eliminação de 35 µg de CsA do vítreo (taxa de eliminação da CsA de 3 µg/dia, item 5.3). Portanto, sugere-se que, para o implante avaliado nesse trabalho, a amplitude da onda B será também normalizada dezessete dias após total eliminação da CsA.

Nessa etapa do estudo, a segurança da utilização do sistema no estudo *in vivo* foi avaliada. A biocompatibilidade do sistema foi confirmada por meio da realização de exames clínicos e do estudo histopatológico do tecido da retina. O exame realizado no microscópio de luz evidenciou a integridade dos constituintes interno do bulbo do olho e ausência de qualquer manifestação inflamatória. Já a análise histopatológica confirmou a manutenção da estrutura e organização do tecido da retina quando o sistema se encontra suspenso no vítreo viscoso. É importante ressaltar que o estudo envolveu animais sadios com olhos normais, para que possíveis efeitos adversos encontrados fossem unicamente relacionados ao sistema e não à possível inflamação intraocular desencadeada ao longo do estudo.

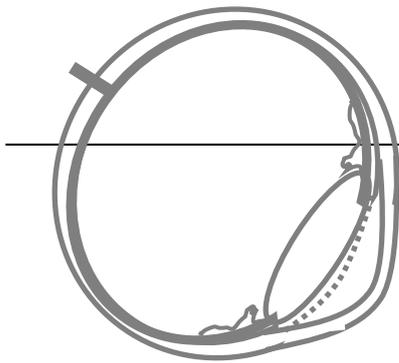
Quanto à toxicidade intraocular, foi observada por estudos de ERG certa supressão da amplitude da onda B nos olhos dos animais que receberam o implante contendo CsA. Essa interferência na função retiniana foi atribuída exclusivamente à quantidade de CsA presente no vítreo nas oito semanas de estudo. A toxicidade observada foi classificada como transitória ao verificar o reestabelecimento da amplitude da onda B quando a CsA foi injetada diretamente na cavidade vítrea em quantidade superior no implante. A fim de investigar o efeito da toxicidade no mecanismo de formação da visão noturna, novos estudos são necessários para determinar se essa supressão compromete, de forma significativa, na adequada formação da visão noturna.

Em resumo, a parte experimental deste trabalho permitiu: 1) validar a metodologia adotada para quantificação da CsA presente no vítreo, 2) sugerir um mecanismo de liberação do fármaco a partir do implante biodegradável

desenvolvido, 3) determinar a quantidade de fármaco disponibilizado e estimar o tempo de permanência da CsA no vítreo, 4) comprovar a biocompatibilidade *in vivo* do sistema e 5) sugerir que a alteração na função retiniana de coelhos, observada com o uso do implante é transitória.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o implante desenvolvido por Saliba e colaboradores (2008, vide anexo) pode ser viável para o tratamento da uveíte posterior resistente à terapia com corticoides quanto à disponibilização da CsA na cavidade vítrea. Foi possível prever que o fármaco foi inicialmente liberado em quantidade suficiente para reverter a inflamação intraocular e permaneceu no vítreo por dezessete meses, período superior ao descrito na literatura (Dong et al., 2006). Ainda, a quantidade de fármaco liberada e eliminada é consideravelmente menor que aquela distribuída no organismo quando esse é administrado por via oral ou sistêmica (Donnenfeld et al., 2009). Em adição, o trabalho mostrou a possibilidade de quantificação da CsA no vítreo pelo método analítico CLAE/EM.

Quanto aos estudos de biocompatibilidade e toxicidade *in vivo* foi possível mostrar que nenhuma alteração nos olhos dos animais que receberam os implantes ocorreu, mas que certo comprometimento na função retiniana foi detectado. No entanto, esse sinal de toxicidade pode ser revertido alguns dias após a total eliminação do fármaco.

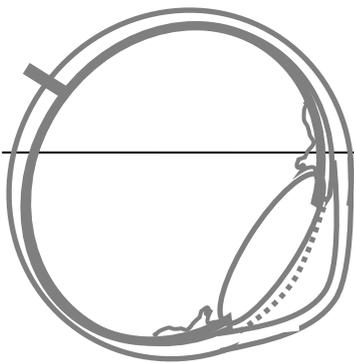


Conclusão

6 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu avaliar a segurança e a viabilidade da utilização do implante biodegradável constituído de PLGA e CsA quanto à disponibilização do fármaco no humor vítreo visando o futuro tratamento de uveíte posterior resistente à terapia com corticoides.

Como perspectiva desse trabalho, propõe-se a realização de novos estudos objetivando a determinação da influência da etapa terciária na liberação da CsA em olhos de coelhos saudáveis, a elucidação do impacto da toxicidade desse sistema no mecanismo de formação da visão noturna bem como obter e avaliar sistemas com menores quantidades do fármaco a fim de reverter a alteração do perfil do ERG observada. Adicionalmente, para comprovar *in vivo* a eficácia terapêutica do sistema, novas pesquisas devem ser realizadas empregando-se modelos experimentais de inflamação ocular.



Contribuições para a literatura

7 CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA

7.1 Artigos publicados

SALIBA, J.B.; FARACO, A.A.G.; YOSHIDA M.I.; VASCONCELOS W.L.; SILVA-CUNHA A.; MANSUR, H.S. Development and Characterization of an Intraocular Biodegradable Polymer System Containing Cyclosporine-A for the Treatment of Posterior Uveitis. **Material Research.**, v. 11, p. 1-5, 2008.

RODRIGUES, L.B.; LEITE H.F.; YOSHIDA M.I.; SALIBA, J.B.; CUNHA JUNIOR A.; FARACO, A.A.G. *In vitro* release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 368, p. 1-6, 2009.

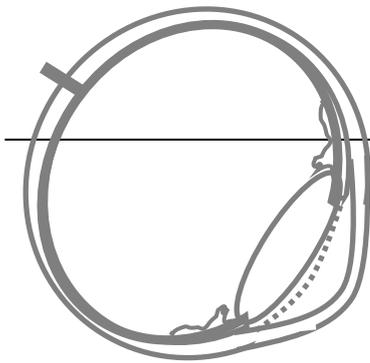
SALIBA, J.B.; SILVA-CUNHA A.; GOMES, E.C.L.; MANSUR, H.S.; SILVA, G.R. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for determination of cyclosporine-A from biodegradable intraocular implants. **Química Nova.**, v. 34, p. 140-144, 2011.

SILVA, G.R.; SILVA-CUNHA A.; SALIBA, J.B.; BERDUGO, M.; GOLDENBERG B.T.; MARIE C. NAUD, M.C.; AYRES E.; ORÉFICE R.L.; BEHAR-COHEN F. Polyurethanes as supports for human retinal pigment epithelium cell growth. **International Journal of Artificial Organs**, v.32, p. 198-209, 2011.

7.2 Artigos para submissão

SALIBA, J.B.; SILVA, R;G.; BEHAR-COHEN F.; MANSUR, H.S.; SILVA-CUNHA A. Characterization and *in vitro* release of Ciclosporine-A from poly(DL-lactide-co-glycolide) implants obtained by solvent/extraction evaporation.

SALIBA, J.B.; RODRIGUES, L.B.; SILVA-CUNHA A.; ZHAO, M.; JEANNY,J.C.; GOLDENBERG B.T.; MARIE C. NAUD.; AYRES E.; ORÉFICE R.L.; BEHAR-COHEN F. Biocompatible polyurethane film releasing dexamethasone for suprachoroidal or sub retinal implantation in the treatment of diseases of the posterior segment of the eye.



Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; CHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 797-793, 1996.

ABENDROTH, D. Experience with therapeutic drug monitoring of cyclosporine. **Transplantation Proceedings**, v.36, p.426-429, 2004.

AKSUNGUR, P.; DEMIRBILEK, M.; DENKBAS, E.B.; VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A.; UNLU, N. development and characterization of cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. **Journal of Controlled Release**, 2011: in press

ALIABADI, H. M.; BROCKS, R.D.; LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of Cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution. **Biomaterials**, v. 26, p. 7251-7259, 2005a

____; MAHMUD, A.; SHARIFABADI, A.; LAVASANIFAR, A. Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of Cyclosporine A. **Journal of Controlled Release**, v. 104, p. 301-311, 2005b

AL-MESHAL, M.A.; KHIDR, S.H.; BAYOMI, H.A.; AL-ANGARY, A.A. Oral administration of liposomes containing cyclosporine: a pharmacokinetics study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.168, p.163-168, 1998.

ALONSO, M.J., CALVO, P., VILA-JATO, J.L., LOPEZ, M.I., LORENTE, J., PASTOR, J.C. Increased ocular corneal uptake of drugs using poly- ϵ -caprolactone nanocapsules and nanoemulsions. In: **International symposium controlled release bioactive materials**, 2., Seattle, 1995.

AMO, E.M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 135-143, 2008.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH SYSTEM PHARMACIST **AHFS**: drug information 2000. Bethesda: c 2000. 3546p.

ANDRYSEK, T.; JEGOROV, A.; VESELSKY, Z.; MATHA, V. Equoral, new cyclosporine drug delivery system, versus neoral: a bioequivalence study in healthy volunteers. **Transplantation Proceedings**, v.35, p.207-209, 2003.

ANSEL, H.C., POPOVICH, N.H.; ALLEN JUNIOR, L.V., **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 8.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005, 775 p.

ATHANASIOU, K. A; NIEDERAUER, G.G.; AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v.17, p.93-102, 1996.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005. 677 p.

BAEYENS, O.F.; EPERON, S.; MORA, P.; LIMAL, D.; SAGODIRA, S.; BRETON, P.; SIMONAZZI, B.; NOBS, L.B.; CROSIER, Y.G.; GURNY, R. Biodegradable scleral implants as new triamcinolone acetone delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.322, p.6-12, 2006.

BENEZRA, D.; MAFTZIR, C.; DE COURTEN.C. Ocular penetration of cyclosporin A. III: The human eye. **British Journal of Ophthalmology**, v. 74, p. 350-352, 1990.

BEHAR-COHEN, F. Systèmes de délivrance des médicaments pour le segment antérieur : bases fondamentales et applications cliniques. **Journal Français de Ophthalmologie**, v. 25, p. 537-544, 2002.

_____ ; KOWALCZUK, L.; KELLER, N.; SALVODELLI, M.; AZAN, F.; JEANNY, J.C. **Anatomie de la rétine**. In : Ophthalmologie. Paris: Elsevier Masson SAS, c2009, 2009.

BENNET, J. C; CECIL, R. L. **Tratado de medicina interna**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 2v.

BERTELMANN, E.; PLEYER, U. Immunomodulatory therapy in ophthalmology: is there a place for topical application. **Ophthalmologica**, v. 218, p. 359-367, 2004.

BOCHOT, A.; LAJAVARDI, L.; CAMELO, S.; BOURGES, J.L.; BEHAR-COHEN, F.; DE KOZAC, Y.; FATTAL, E. Potentiel des liposomes pour l'injection intravitréenne de molécules thérapeutiques. **Annales Pharmaceutiques Française**, p. 1-8, 2011.

BODAGHI, B. ; WECHSLER, B. ; DU-BOUTIN, L.T.H. ; CASSOUX N.; LEHOANG , P. ; PIETTE, J.C. Chronic severe uveitis: classification, search for etiology and therapeutic approach. **La revue de médecine interne**, v. 24, p. 794–802, 2003.

BOURGES, J.L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; FROUSSART, F.; BOCHOT, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Intraocular implants for extended drug delivery: **Therapeutic applications Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p.1182–1202, 2006.

_____, TOUCHARD, E.; KOWALCZUK, L.; BERDUGO, M.; THOMAS-DOYLE, A.; BOCHOT, A.; GOMEZ, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BEHAR-COHEN, F. Dispositifs de délivrance de principes actifs pour des applications ophtalmologiques. **Journal Français de Ophthalmologie**, v. 30, p. 1070-1088, 2007.

BOREL, J.F.; FEURER, c.; GUBLER, H.V.; STAHELLIN, H. Biological effects of CsA: a new antilymphocytic agent. **Agents Actions**, v.6, p.468-475, 1976 *apud* REZZANI, R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 2004, p. 85-128, 2004.

BOYD, S.R.; YOUNG, S.; LIGHTMAN, S. Immunopathology of noninfectious posterior and intermediate uveitides. **Survey of Ophthalmology**, v.46, n.3, p.209-233, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

CALNE, R.V.; WHITE, D.J.G. Cyclosporine A: a powerful immunosuppressant in dogs with renal allografts. **CRS Medical Science**, v.5, p.595, 1998 *apud* GRAEB, C.; ARBOGAST, H.; GUBA, M.; JAUCH, K.W.; LAND, W. Cyclosporine: 20 years of experience at the University of Munich. **Transplantation Proceedings**, v.36, p. 125-129, 2004.

CHEN, J.C.; BROWN, B.; SCHMID, K.L. Retinal adaptation responses revealed by global Xash multifocal electroretinogram are dependent on the degree of myopic refractive error. **Vision Research**, v. 46, p. 3413–3421, 2006.

CHIMALAKONDA, P. A.; SHAH, B. R.; MEHVAR, R.; High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin A in rat blood and liver using a commercially available internal standard. **Journal of Chromatography B**, V. 72, p.107-114, 2002.

CHOONARA, Y.E.; PILLAY, V.; DANCKWERTS, M.P.; CARMICHAEL, T.R.; DU TOIT, L.C. A Review of Implantable Intravitreal Drug Delivery Technologies for the Treatment of Posterior Segment Eye Diseases. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p.2219-2239, 2009.

COLTHURST, M.J.; WILLIAMS, R.L.; HISCOTT, P.S.; GRIERSON, I. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. **Biomaterials**, v.21, p.649-665, 2000.

CUNHA-VAZ, G.J. The blood-ocular barriers: past, present, and future. **Documenta Ophthalmologica**, v.93, p.149-157, 1997.

DICK, A.; LIVERSIDGE, J.; COPE, A.P. The role of tumour necrosis factor (TNF- α) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). **Progress in Retinal and Eye Research**, v.23, p.617-637, 2004.

DIENBOLD, Y.; CALONGE, M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, p. 596-609, 2010.

DING, S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. **PSIT**, v.1, n.8, p. 328-335, 1998.

DONG, X.; SHI, W.; YUAN, G.; XIE, L.; WANG, S.; LIN, P. Intravitreal implantation of the biodegradable Cyclosporine A drug delivery system for the experimental chronic uveitis. **Graefe's Archive Experimental Ophthalmology**, v.244, p.492-497, 2006.

DONG, C.J.; HARE, W.A. Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third-order retinal neurons in the rabbit retina. **Vision Research**, v. 40, p. 579-589, 2000.

DONNEFELD, E.; STEPHEN, C.; PFLUGFELDER, C. Topical Ophthalmic Cyclosporine: Pharmacology and Clinical Uses. **Survey of Ophthalmology**, v. 54, p. 321-337, 2009.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara -Koogan, c1997. 663p.

FIALHO, Silvia Ligório. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e implantes biodegradáveis para aplicação oftálmica**. Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 2003. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos).

_____; REGO, M.G.B.; CARDILHO, J.A.; SIQUEIRA, R.B.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A. Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.891-896, 2003.

_____; CUNHA, A.S. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. **Drug Delivery**, v.12, p.109-116, 2006.

_____; BEHAR-COHEN, F.; SILVA-CUNHA, A. Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 637-646, 2008.

GILGER, B.C.; MALOK, E.; STEWART, T.; HOROHOV, D.; ASHTON, P.; SMITH, T.; JAFFE, G.L.; ALLEN, J.B. Effect of an cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.76, p. 239-255, 2000.

GOKCE, E.H.; SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; GUNERI, T.; CAMELLA, C. Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 76-86, 2008.

GUPTA, C.; CHAUHAN, A. Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctual plugs. **Journal of Controlled Release**, v. 150, p. 70-76, 2010.

GRAEB, C.; ARBOGAST, H.; GUBA, M.; JAUCH, K.W.; LAND, W. Cyclosporine: 20 years of experience at the University of Munich. **Transplantation Proceedings**, v.36, p. 125-129, 2004.

GRIFFITH, L.G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v.48, p.263-277, 2000.

HE, Y.; WAG, J.C.; LIU, Y.L.; MA, Z.Z.; ZHU, X.A.; ZHANG, Q. Therapeutic and toxicological evaluation of cyclosporine A microspheres as an treatment vehicle for uveitis in rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, p. 121-131, 2006.

HESSELINK, D.A.; BAARSMA, G.S.; KUIJPERS, R.W.A.M.; HAGEN, P.M. Experience with cyclosporine in endogenous uveitis posterior. **Transplantation Proceedings**, v. 36, p. 372-377, 2004.

HORNOF, M.; TOROPAINEN, E.; URTTI, A. Cell culture models of the ocular barriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V. 60, p. 207–225, 2005.

HUGHES, P.M.; OLEJNIK, O.; CHANG-LIN, J.E.; WILSON, C.G. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2010–2032, 2005.

ITALIA, J.L.; BHATT, D.K.; TIKOO, K.; KUMAR, M.N.V.R. PLGA nanoparticles for oral delivery cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to sandimmune neoral®. **Journal of Controlled Release**, v.119, p.197-206, 2007.

JABS, D.A.; ROSEMUNBAUM, J.T.; FOSTER, C.S.; HOLLAND, G.N.; JAFFE, G.J.; LOUIE, J.S.; NUSSENBLAT, R.B.; STIEHM, E.R.; TESSLER, H.; GELDER, R.N V.; WHITCUP, S.M.; YOCUM, D. Guidelines for the use of immunosuppressive drugs in patients with ocular inflammatory disorders: recommendatios of an expert panel. **American Journal of Ophthalmology**, v.130, n.4, p. 492-513, 2000.

JAFFE, G.J.; BEN-NUN, J.; GUO, H.; DUNN, J.P.; ASHTON, P. Fluocinolone Acetonide sustained drug delivery device to treat severe uveitis. **Ophthalmology**, v.17, p. 2024-2033, 2000.

_____; MARTIN,D.;CALLANAN, D; PEARSON, A.P; LEVY,B.; COMSTOCK, T. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis. **Ophthalmology**, v. 113, n 6, p. 1020-1027, 2006.

_____; YANG, C.S.; WANG, X.C.; COUSINS, S.W.; GALLEMORE, R.P.; ASHTON, P. Intravitreal sustained-release cyclosporine in the treatment of experimental uveitis. **Ophthalmology**, v.105, p. 46-56, 1998.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JAIWAL, J.; GUPTA, S.K.; KREUTER, J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. **Journal of Controlled Release**, v.96, p.169-178, 2004.

JANOT, Paulo. Anatomia do olho. Brasília: OftalmoJanot, 2006. Disponível em: <http://www.oftalmojanot.com.br/2006/4/18/Pagina35.htm>. Acesso em 10/01/2011.

JARVINEN, K., JARVINEN, T., URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p.3-19, 1995.

_____, JARVINEN, T., URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p.3-19, 1995

JEGOROV, A.; HUSÁK, M.; KRATOCHVÍL, B.; CÍSAROVÁ, I. How many new entities can be created from one active substance? The case of cyclosporine A. **Crystal Growth & Design**, v.3, n.4, p.441-444, 2003.

KANAI, A.; ALBA, R.M.; TAKANO, T.; KOBAYASHI, C.; NAKAJIMA, A.; KURIHARA, K.; YOKOYAMA, K.; FUKAMI, M. The effect on the cornea of the alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporine eye drops. **Transplantation Proceeding**, v.21, p.1-3, 1989.

KANSKI, J.J. **Clínical ophthalmology: a systematic approach**. 3.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann International Editions, 1994.

KAUR, I.P.; GARG, A.; SINGLA, A.K.; AGGARWAL. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p.1-14, 2004.

KATO, A., KIMURA, H., OKADE, K., OKADE, J., KUNOU, N., OGURA, Y. Feasibility of drug delivery to the posterior pole of the rabbit eye with a episcleral implant. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.45, p. 238-244, 2004.

KIM, H. ; CSAKY, K.G ; CHAN, C.C.; BUNGAY P.M.; LUTZ R.J. ; DEDRICK, R.L, YUAN, P. ; ROSENBERG, J. ; GRILLO-LOPEZ, A.J, WILSON, W.H. ; ROBINSON, M.R. The pharmacokinetics of rituximab following an intravitreal injection, v. 82, p. 760-766, 2006.

KOWALCZUC, Laura. **Application de l'électrotransfert à l'étude des maladies oculaires inflammatoire et angiogéniques**. Paris, Ecole Doctorale ABIES do Institut des Sciences et Technologies (ParisTech), 2010. Tese (Doutorado Ciências da Vida e da Saúde).

KULKARNI, P. Review: Uveitis and immunosuppressive drugs. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 17, p. 181-187, 2001.

KUNOU, N.; OGURA, Y.; HASHIZOE, M.; HONDA, Y. Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 143-150, 1995.

_____.; _____.; YASUKAWA, T.; KIMURA, H.; MIYAMOTO, H.; HONDA, Y.; IKADA, Y. Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 263-271, 2000.

LALLEMAND, F.; BAEYENS, O.F.; NESSEGHIR, K.; COHEN, F.B.; GURNY, R. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.56, p. 307-318, 2003.

LAUDE, A.; PATTON, N.; DHILLON, B.; TAN, L.E.; WILSON, C.G.; LASCARATOS, G.; ELASHRY, M.; ASLAM, T.; PATTON, N.; DHILLON, B. Intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration and inter-individual variations in vitreous pharmacokinetics. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, p. 466-475, 2010.

LAFFERTY KJ, HODGKIN P. Cyclosporin A (CsA): models for the mechanism of action. . **Transplantation Proceedings**, v. 15, p. 2242-2247, 1983.

LAZAROVA, T.; CHEN, J.S.; HAMANN, B.; KANG, J.M.; TROMBINO, D.H.; HAN, F.; HOFFMANN, E.; MCCLURE, C.; ECKSTEIN, J.; OR, Y.S. Synthesis and biological evaluation of novel Cyclosporine A analogues: potential soft drugs for the treatment of autoimmune disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.674-676, 2003.

LEE, S.L.; KIM, H.; WANG, N.S.; BUNGAY, P.M.; GILGER B.C.; YUAN, P.; KIM, J.; CSAKY, K.G.; ROBINSON, M. A pharmacokinetic and safety evaluation of an episcleral cyclosporine implant for potential use in high-risk keratoplasty rejection. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, p. 2023-2030, 2007.

LEE, S.S.; HUGHES, P.; ROSS, A.D.; ROBINSON, M.R. Biodegradable Implants for Sustained Drug Release in the Eye. **Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 2043–2053, 2010.

LEWIS, D.H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glucolide polymers. In: CHASIN, M.; LANGER, R. **Biodegradable polymers as drug delivery system**. New York: Marcel Dekker, p.01-41, 1990. *apud* FIALHO S.L., REGO, M.G.B.; CARDILHO, J.A.; SIQUEIRA, R.B.; JORGE, R.; CUNHA, A.S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.891-896, 2003b.

LI, Y.; ZHU, K.J.; JIANG, H.L.; LIU, J.H.; HAO, Y.L.; YASUDA, H.; ICHIMARU, A.; YAMAMOTO, K. In vitro and in vivo studies of cyclosporin A-loaded microspheres

based on copolymers of lactide and ϵ -caprolactone: Comparison with conventional PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v.295, p.67-76, 2005.

LIU, H.; WANG, Y.; YAO, H.; ZANG, Y. Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of Cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v.311, p.182-186, 2006.

LLOYD, A.W.; FARAGHER, R.G.A.; DENYER, S.P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, v. 22, p. 769-785, 2001.

LOO, S.C.J.; OOI, C.P.; BOEY, Y.C.F. Radiation effects on poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly (L-lactide) (PLLA). **Polymer Degradation and Stability**, v.83, p.259-265, 2004.

LOOR, F.; TIBERGHIE, F.; WENANDY, T.; DIDIER, A.; TRABER, R. Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human MDR1 P-glycoprotein ABC transporter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.4598-4612, 2002.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical chemistry**, v. 75, p. 3019-3030, 2003.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress of Polymers Science**, v.23, p. 563-580, 1998.

MESSIAS, A.; GEKELER, F.; WEGENER, A.; DIETZ, K.; KONLER, K.; ZRENNER, E. Retinal safety of a new fluoroquinolone, pradofloxacin, in cats: assessment with electroretinography. **Documenta Ophthalmologica**, v. 116, p. 177-191, 2008.

MICHELSON, J.B.; NOZIK, R.A. Experimental endophthalmitis treated with an implantable osmotic minipump. **Archive of Ophthalmology**, v.97, p.1375-1346, 1979. *apud* PEYMAN, G.A.; GANIBAN, G.J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 107-123, 1995.

MYLES, E.M.; NEUMANN, D.M.; HILL, J.M. Recent progress in ocular drug delivery for posterior segment disease: Emphasis on transscleral iontophoresis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2063-2079, 2005.

NAIK, R.; MUKHOPADHYAY, A.; GANGULI, M. Gene delivery to the retina: focus on non-viral approaches. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 306-315, 2009.

NOCHOS, A.; DOUROUMIS, D.;BOUROPOULOS, N. In vitro release of bovine serum albumin from alginate/HPMC hydrogel beads. **Carbohydrate Polymers**, v 74, p. 451–457, 2008.

OKADE, J.; KIMURA, H.; KONU, N.; OKADE, K.; OGURA, Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intra-ocular delivery of betamethasone phosphate. **Investigate Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n.2, p.740-744, 2003.

OFFRET, H.; LABETOULLE, M.; FRAU, E. **Thérapeutiques médicamenteuses en ophtalmologie**. 2. ed. Paris: Masson Editeur., c2003. 663p.

PEYMAN, G.A.; GANIBAN, G.J. Delivery systems for intraocular routes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 107-123, 1995.

PEARSON, P.A.; JAFFE, G.L.; MARTIN, D.F.; CORDAHI, G.J.; GROSSNIKLAUS, H.; SCHMEISSER, E.T.; ASHTON, P. Evaluation of a delivery system providing long-term release of cyclosporine. **Archives of Ophthalmology**, v. 114, p. 311-317, 1996.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.447-451, 2001.

PLEYER, U., ELKINS, B., RUCKERT, D., LUTZ, S., GRAMMER, J., CHOU, J., SCHMIDT, K.H., MONDINO, B.J. Ocular absorption of Cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields. **Current Eye Research**, v.13, p.177-181, 1994.

POLLARD, S.; NASHAN, B.; JOHNSTON, A.; HOYER, P.; BELITSKY, P.; KEOWN, P.; HELDERMAN, H. A pharmacokinetic and clinical review of the potential clinical impact using different formulations of cyclosporine A. **Clinical Therapeutics**, v.25, n.6, p.1654-1699, 2003.

PRAS, E.; NEUMANN, R.; GODDARD, G.; LEVY, Y.; ASSIA, E.I.; SHOENFELD, Y.; LANGEVITZ, P. Intraocular inflammation in autoimmune disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.34, p. 602-609, 2004.

PREVENT BLINDNESS AMERICA. Brasil, 2010. Disponível em <<http://www.preventblindness.org/uveitis/what/types.html>>. Acesso: 20 dez. 2010.
RONY, Dr. Instituto de Retina. Brasil, 2008. Disponível em <[http:// www. institutoderetina.com.br /anatomia.asp](http://www.institutoderetina.com.br/anatomia.asp)>. Acesso em 15 jan. 2010.
REZZANI, R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 2004, p. 85-128, 2004.

SCHLIECKER, G.; SCHMIDT, C.; FUCHS, S.; EHINGER, A.; SANDOW, J.; KISSEL, T. In vitro and in vivo correlation of buserelin release from bioegradable implants using statistical moment analysis. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 25-37, 2004.

SAKAGUCHI, M.; SUGITA, S.; ITOH, K.; MOCHIZUKI, M. Cytokine production by T cells infiltrating in the eye of uveitis patients. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.42, p.262-268, 1998.

SAKURAI, E.; NOZAKI, M.; OKADE, K.; KUNOU, N.; KIMURA, H.; OGURA, Y. Scleral plug of biodegradable polymers containing tacrolimus (FK506) for experimental uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 44, p. 4845 – 4852, 2003.

SALIBA, J.B.; FARACO, A.A.G.; YOSHIDA M.I.; VASCONCELOS W.L.; SILVA-CUNHA A.; MANSUR, H.S. Development and Characterization of an Intraocular Biodegradable Polymer System Containing Cyclosporine-A for the Treatment of Posterior Uveitis. **Material Research.**, v. 11, p. 1-5, 2008.

_____.; SILVA-CUNHA A.; GOMES, E.C.L.; MANSUR, H.S.; SILVA, G.R. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for determination of cyclosporine-a from biodegradable intraocular implants. **Química Nova.**, v. 34, p. 140-144, 2011.

SANHARAWI, M., KOWALCZUK, L.; TOUCHARD, E.; OMRI, S.; DE KOZAK, Y.; BEHAR-COHEN, F. Protein delivery for retinal diseases: From basic considerations to clinical applications. **Progress in Retinal and Eye Research**, p. 1-23, 2010.

SIEPMAN, J.; SIEPMAN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328-343, 2008.

SILVA, M.V; RODRIGUEZ-ARES, M.T.; SALORIO, M.S.; DÍAZ, M.J.; ALVAREZ, J.C.; JATO, J.L.; TOMÉ, C.C. Efficacy of subconjunctival cyclosporine-containing microspheres on keratoplasty rejection in the rabbit. **Graefe's Archival Clinical Experience Ophthalmology**, v. 237, p. 840-847, 1999.

SILVA, R.G.; FIALHO, S.L.; SIQUEIRA, R.C.; JORGE, R.; CUNHA-JUNIOR, A. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. *Brazilian Journal of Pharmaceutics*, v. 46, p. 585-595, 2010.

STEVENSON, C.L.; TAN, M.M.; BASTELLEROS, D.L. Secondary structure of cyclosporine in a spray-dried crystal by FTIR. **Journal of pharmaceutical Science**, v. 92, p.1-12, 2003.

SRIVASTAVA, A.; RAJAPPA, M.; KAUR, J. Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. **Clínica Chimica Acta**, v.411, p. 1165–1171, 2010.

TAYLER, S.; HARITOGLOU, C.; CHORAGIEWICZ, T.J.; MESSIAS, A.; BARYLUK, A.; MAY, A.; REJDAK, R.; FIEDOROWICZ, M.; ZRENNER, E.; SCHETTAUF, F. In vivo toxicity study of Rhodamine 6G in the rat retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, p. 2120-2126, 2008.

TAYLOR, J. P.; BROWN, R. S.; COOPER, P. D.; SLAM, P.; MORRIS, R. M.; PILLANS, I. P.; LYNCH, V. S. Evaluation of 3 Internal Standards for the Measurement of Cyclosporin by HPLC–Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 1890-1893, 2005.

THALER, S., HARITOGLOU, C., CHORAGIEWICZ, T.J., MESSIAS, A., BARYLUK, A., MAY, A., REJDAK, R., FIEDOROWICZ, M., ZRENNER, E., SCHUETTAUF, F. In vivo toxicity study of Rhodamine 6G in the rat retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.49, p. 2120-2126, 2008.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeil Convention Inc., 2000. (NF19).

VALLELADO, A.I.; LÓPEZ, M.I.; CALONGE, M.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M.J. Efficacy and safety of microspheres of cyclosporine A, a new systemic formulation, to prevent corneal graft rejection in rats. **Current Eye Research**, v. 24, p. 39-45, 2002.

VELEZ, G.; WHITCUP, S.M. **New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular diseases**. Brazilian Journal of Pharmaceutics, v. 83, p. 1225-1229, 2009.

WALTON, R.C.; NUSSENBLATT, R.B.; WHITCUP, S.M. Cyclosporine therapy for severe sight-threatening uveitis in children and adolescents. **Ophthalmology**, v. 105, p. 2028-2034, 1998.

YASUKAWA, T.M.D.; KIMURA, H.; TABATA, Y.; OGURA, Y. Intraocular sustained delivery using implantable polymeric device. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 25-36, 2001.

_____.; OGURA, Y.; SAKURAI E.; TABATA, Y.; KIMURA H. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2033-2046, 2005.

YENICE, I.; MOCAN, M.C.; PALASKA, E.; BOUCHOT, A.; BILENSOY, E.; VURAL, I.; IRKEÇ, M.; HINCAL, A. Hyaluronic acid poly-ε-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. **Experimental Eye research**, v. 87, p. 162-167, 2008.

ZHOU, T.; LEWIS, H.; FOSTER, R. E.; SCHWENDEMAN, S. P. Development of a multiple-drug delivery implant for intra-ocular management of proliferative vitreoretinopathy. **Journal of Controlled Release**, v.55, p. 281-295, 1998.