

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**LIBERAÇÃO PROLONGADA DE DEXAMETASONA
INTRAVÍTREA EM COELHOS ATRAVÉS DE UM
SISTEMA BIODEGRADÁVEL**

Marcelo Guimarães Brandão Rêgo

Ribeirão Preto
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**LIBERAÇÃO PROLONGADA DE DEXAMETASONA
INTRAVÍTREA EM COELHOS ATRAVÉS DE UM
SISTEMA BIODEGRADÁVEL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Co-orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Jr.

Ribeirão Preto
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Rêgo, Marcelo Guimarães Brandão

Liberação prolongada de dexametasona intravítrea em coelhos através de um sistema biodegradável. Ribeirão Preto, 2005.

94 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Oftalmologia.

Orientador: Jorge, Rodrigo.

1. Dexametasona. 2. Implantes biodegradáveis. 3. Liberação prolongada. 4. Retina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Guimarães Brandão Rêgo

Liberação prolongada de dexametasona intravítrea em coelhos através de um sistema biodegradável.

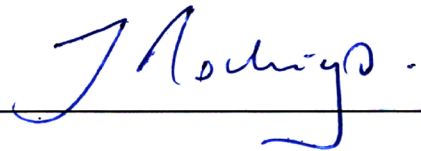
Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor.
Área de concentração: Oftalmologia

Aprovado em: 19, 8, 2005

Banca Examinadora

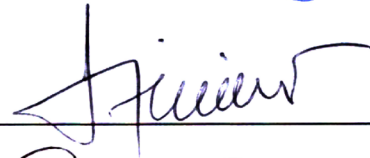
Prof. Dr. Rodrigo Jorge
Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____



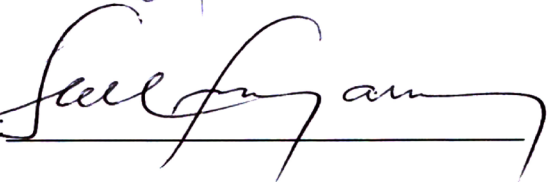
Prof. Dr. Eduardo Miguel Laicine
Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____



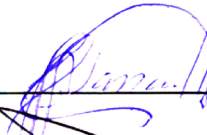
Prof. Dr. Suel Abujamra
Instituição: FM-USP

Assinatura: _____



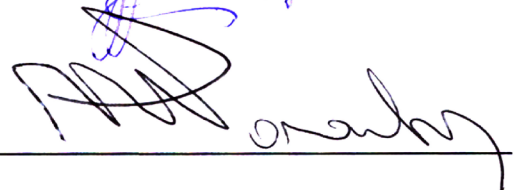
Prof. Dr. João Jorge Nassaralla Jr.
Instituição: FM-UNB

Assinatura: _____



Prof. Dr. Flávio Rocha Lima Paranhos
Instituição: FM-UFG

Assinatura: _____



Aos meus queridos pais, Bráulio e Márcia, e às minhas irmãs, Giselle e Liliane, pelo apoio constante em cada caminhada, e às minhas avós, Amélia e Idalcina, exemplos para toda a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir-me crescer profissionalmente com imensa vontade de fazer o melhor.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge, meu professor e amigo, pela orientação e empenho extraordinário para que o trabalho fosse concluído com sucesso.

Ao Prof. Armando da Silva Cunha Jr., da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela atenção e conselhos desde o princípio.

Ao Dr. Rubens Siqueira, cujo entusiasmo proporcionou excelentes condições para nossas cirurgias e para a obtenção dos resultados.

À Sílvia Fialho, da UFMG, responsável pelos estudos farmacológicos com muita dedicação e competência.

Ao Dr. José Augusto Cardillo, cujo espírito científico tornou-se grande incentivo durante todo o estudo.

Ao Prof. Antônio Haddad, pela valiosa contribuição para a obtenção das imagens histológicas.

Ao Prof. Antônio Luiz Rodrigues Jr., pela ajuda indispensável na análise estatística dos dados do trabalho.

À Camila e à D. Ivete, pelo cuidado e incentivo em todos os momentos.

Ao Romero, Stella, Romerinho e Rodrigo, que me acolheram quando todo o trabalho tornou-se concreto.

À Mila e Rafael, amigos do estágio e da pós-graduação.

Ao Halin, Alfredo, Marcos, Vanessa, Márcia, e a todos do Hospital Veterinário pela receptividade e interesse pelo sucesso do trabalho.

Àqueles que se transformaram no meu braço direito no laboratório: Vani, Izilda, Tuca, Flávia e Domingos, a minha eterna gratidão.

À Mara e ao Marcos, que cederam espaço para que nossas amostras fossem conservadas corretamente.

À Cecília, Amélia, Rita, Rogério, Ivone e Edson, pela amizade no Departamento de Oftalmologia.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Faculdade de Medicina Veterinária da UNIRP, por disponibilizar o hospital onde as cirurgias foram realizadas, seus profissionais e o biotério.

À CAPES, CNPq e FAEPA, pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de hidrólise de PLA, PGA ou PLGA (Adaptado de MERKLI et al., 1998).....	18
Figura 2 – Implante utilizado nas cirurgias (gradação em milímetros)	36
Figura 3 – Antissepsia pré-operatória periocular direita	39
Figura 4 – Animais no pós-operatório imediato, sob efeito da anestesia	39
Figura 5 – Cirurgia para a colocação do implante acompanhada por médico veterinário	40
Figura 6 – Ambiente no qual os animais foram mantidos durante o estudo	40
Figura 7 – Esclerotomia pela qual o implante foi inserido	41
Figura 8 – Colocação do implante através da esclerotomia	42
Figura 9 – Sutura da esclerotomia após a colocação do implante	42
Figura 10 – Preparo dos olhos experimentais para o estudo histopatológico ...	46
Figura 11 – Olho experimental enucleado, livre dos tecidos adjacentes	46
Figura 12 – Concentrações de dexametasona intravítrea ao longo das semanas de estudo	52
Figura 13 – Distribuição da média aritmética e da mediana das concentrações de dexametasona intravítrea, em cada semana de estudo.	52

Figura 14 – Apresentação dos intervalos de confiança (95%) para as médias amostrais de dosagem de dexametasona intravítrea, ao longo das semanas do estudo. Letras iguais implicam em diferença estatística com 5% de significância.	53
Figura 15 – Implante posicionado no sítio da esclerotomia ao final da primeira semana	55
Figura 16 – Comportamento das médias (A) e medianas (B) dos valores de pressão ocular dos olhos experimentais, de ambos os grupos, ao longo do estudo (pré: pré-operatório).	56
Figura 17 – Representação esquemática das curvas obtidas no estudo eletrorretinográfico (resposta máxima combinada) de um olho experimental de um animal do grupo I antes da cirurgia para a colocação do implante (esquerda) e após 8 semanas (direita).	57
Figura 18 – Médias (A) e medianas (B) das amplitudes das ondas A e B, nos animais do grupo I, antes da cirurgia para a colocação do implante e após 8 semanas.	58
Figura 19 – Corte de retina de um animal do grupo I. (A) Aspecto morfológico normal preservado. Corte semifino; corado com azul de toluidina. Barra: 50 μm . (B) Maior aumento do segmento destacado na foto superior. Barra: 10 μm . Observar a camada de fotorreceptores com alguns cones atípicos (seta) e bastonetes (asterisco).	60
Figura 20 – Corte de retina de um animal do grupo II. A morfologia normal está preservada. Observar os espaços encontrados entre as células de Müller, na camada de células ganglionares (seta maior), e cones atípicos (seta menor). Corte semifino; corado com azul de toluidina. Barra: 20 μm	61
Figura 21 – Eletromicrografia da retina de um animal do grupo I. Região da camada de fotorreceptores, mostrando cone atípico (C) e vários bastonetes (B), sem alterações morfológicas. Observa-se o segmento interno de um cone (SI) com mitocôndria. Barra: 1 μm	61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Potência relativa e dose equivalente dos corticosteróides (Adaptado de HAYNES-JR; MURAD, 1990).24
- Tabela 2** – Apresentação das concentrações intravítreas observadas, a cada semana, com as respectivas médias aritméticas, medianas, desvios-padrão e intervalos de confiança. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	angiofluoresceinografia
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
AV	acuidade visual
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CMV	citomegalovírus
DMRI	degeneração macular relacionada à idade
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EPC	células progenitoras endoteliais
EPR	epitélio pigmentado da retina
ERG	eletrorretinograma
EUA	Estados Unidos da América
EVA	acetato etileno-vinílico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HSC	células-tronco hematopoéticas
ISCEV	<i>International Society of Electrophysiology of Vision</i>
NVC	neovascularização de coróide
OCT	tomografia de coerência óptica
OVCR	oclusão de veia central da retina
PGA	polímero derivado do ácido glicólico
PLA	polímero derivado do ácido lático
PLGA	co-polímero dos ácidos lático e glicólico
PVA	álcool polivinílico
PVR	proliferação vítreo-retiniana
SDF-1	fator derivado de células estromais-1
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNIRP	Universidade de Rio Preto
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
TER	resistência transepitelial
ZO-1	<i>zonulae occludens-1</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
µg	micrograma
µm	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado
µL	microlitro
cm ²	centímetro quadrado
g	grama
kDa	quilodáton
Kg	quilograma
M	molar
mA	miliampères
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mmHg	milímetro de mercúrio
ng	nanograma
°C	graus Celsius
p/p	peso por peso
pH	potencial de hidrogênio

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o perfil de liberação intravítrea de dexametasona a partir de um sistema biodegradável, em olhos de coelhos, além da ocorrência de possível toxicidade retiniana que pudesse ser causada pela presença da droga ou do polímero na cavidade vítrea.

Foram utilizados sessenta coelhos albinos machos no estudo. Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo I era composto de 38 coelhos, que receberam implantes intravítreos no olho direito preparados com o co-polímero derivado dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) em proporções iguais (50:50) e contendo 1,0 mg de dexametasona. O grupo II (grupo controle) era formado por 22 animais nos quais foram colocados implantes também no olho direito contendo apenas o PLGA, sem a droga. Para o estudo de dosagem de dexametasona pelo método *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) foram empregados 48 coelhos, sendo escolhidos aleatoriamente 32 animais do grupo I e 16 do grupo II. Para o estudo de toxicidade, 12 coelhos foram utilizados, sendo escolhidos aleatoriamente seis de cada grupo. Vinte e quatro horas antes da cirurgia e na oitava semana, os 6 coelhos do grupo I foram submetidos ao eletrorretinograma. Após oito semanas, esses 12 animais foram sacrificados e tiveram os olhos direitos processados para análise histopatológica.

A concentração intravítrea de dexametasona observada nos olhos dos animais do grupo I apresentou média de 613,6 ng/ml na primeira semana de avaliação; nas semanas dois e três as médias foram de 308,6 ng/ml e 326,5 ng/ml, respectivamente. Na quarta semana a média encontrada foi de 856,1 ng/ml, e na quinta semana, 2172,3 ng/ml. Após seis semanas da cirurgia para a colocação

do implante a média foi de 2589,3 ng/ml. Na sétima semana esse valor foi de 2660,3 ng/ml e na oitava, de 2559,2 ng/ml. Não foram observadas alterações morfológicas na retina dos animais de ambos os grupos ao exame através de microscopia de luz e eletrônica, assim como sinais de toxicidade retiniana no exame de eletrorretinograma. Um coelho evoluiu com endoftalmite e outro, com descolamento de retina, ambos do grupo I.

Os resultados mostraram que o implante biodegradável contendo dexametasona permitiu a liberação controlada da droga para a cavidade vítrea em níveis terapêuticos, sem causar toxicidade. Estudos futuros poderão garantir sua aplicabilidade clínica, como uma importante alternativa para o tratamento de diversas doenças vítreo-retinianas.

ABSTRACT

The purpose of the study was to determine the pharmacokinetic profile of an intravitreal biodegradable drug delivery system designed to release dexamethasone, in rabbits, and evaluate potential signs of toxicity to the retina.

Sixty New Zealand white rabbits, divided in two groups, were enrolled in the study. In group I, devices containing dexamethasone were implanted surgically into the vitreous of the right eye of 38 New Zealand White rabbits. Twenty-two control rabbits (group II) received the intravitreal implant without drug. Four animals were euthanized at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 weeks following implantation and intravitreal drug levels were determined in 32 rabbits of group I by *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). The vitreous of two control rabbits of group II were also analyzed weekly. All the rabbits were evaluated at these time periods by external examination and indirect ophthalmoscopy. Ocular pressure of the experimental eye was measured in 4 animals in each group preoperatively and on weeks 4 and 8. Six animals in each group were randomly chosen 8 weeks after surgery for light and electron microscopy examinations. Electroretinography (ERG) was performed on both eyes of each of six rabbits of group I at baseline and 8 weeks after implantation.

At 1 week after implantation, the mean dexamethasone intravitreal concentration in the group I was 613,6 ng/ml, dropping to 308,6 ng/ml and 326,5 ng/ml on weeks 2 and 3, respectively. By 4 weeks, the vitreous levels were 856,1 ng/ml and on week 5, 2172,3 ng/ml. After 6 weeks, the mean concentration was 2589,3 ng/ml. Vitreous levels were 2660,3 ng/ml after 7 weeks and 2559,2 ng/ml on week 8. There was no evidence of toxic effects on both groups based on histological

and ERG findings. One animal had endophthalmitis and another one had retina) detachment, both of them from group I.

Our findings showed that the biodegradable device provided prolonged release of dexamethasone in the vitreous within the therapeutic range. No toxic reactions in the retina were observed. Future studies are required to determine its clinical application in various vitreoretinal diseases.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
	1.1 VIAS CONVENCIONAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS PARA O OLHO	3
	1.1.1 Via Tópica	4
	1.1.2 Via Periocular	6
	1.1.3 Via Intraocular	7
	1.1.4 Via Sistêmica	8
	1.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA	9
	1.2.1 Tipos de sistemas utilizados em liberação prolongada	11
	1.2.2 Implantes oculares e polímeros usados na sua preparação	16
	1.2.3 Desvantagens	20
	1.3 CORTICOSTERÓIDES	21
	1.4 APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS DOS CORTICOSTERÓIDES EM DOENÇAS DO SEGMENTO POSTERIOR DO OLHO	25
	1.5 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	31
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
	3.1 PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES	35
	3.1.1 Materiais	35
	3.1.2 Obtenção dos implantes biodegradáveis	35
	3.2 ANIMAIS	37
	3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	41

3.4	DOSAGEM DE DEXAMETASONA INTRAVÍTREA.....	43
3.5	ESTUDO DE TOXICIDADE RETINIANA	44
3.5.1	Observação clínica	44
3.5.2	Eletrorretinografia	44
3.5.3	Estudo histopatológico	45
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4	RESULTADOS	50
4.1	DOSAGEM DE DEXAMETASONA	51
4.2	OBSERVAÇÃO CLÍNICA	54
4.3	ELETORRETINOGRRAFIA.....	57
4.4	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	59
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	77
7	REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento farmacológico permitiu o surgimento de inúmeras drogas com potencial aplicação no tratamento de doenças intraoculares. As vantagens do olho em tratamentos farmacológicos e cirúrgicos são decorrentes de sua acessibilidade e transparência.

Cada vez mais, novas pesquisas são direcionadas para as patologias capazes de provocar perda visual grave como o glaucoma, a degeneração macular relacionada à idade e a retinopatia diabética. O sucesso terapêutico, entretanto, está intimamente relacionado à disponibilidade de uma via de administração que permita a atuação da droga no sítio desejado.

A via de administração mais utilizada é a tópica, que se mostra adequada apenas para pacientes que apresentam comprometimento do segmento anterior do olho, constituído pela córnea, câmara anterior, íris, câmara posterior, corpo ciliar e cristalino. Quando o alvo da medicação é o segmento posterior do olho, composto pelo vítreo, retina, epitélio pigmentado da retina (EPR) e coróide, o tratamento torna-se difícil devido à baixa penetração das drogas.

Visando a aumentar a eficácia do tratamento de doenças vítreo-retinianas, têm sido utilizadas as injeções. Por meio de injeção subconjuntival ou subtenoniana, a droga pode ser depositada próxima à esclera para que atinja o segmento posterior, difundindo-se através dela. As injeções realizadas diretamente no interior da cavidade vítrea garantem níveis terapêuticos da droga dentro do vítreo, porém, assim como as injeções perioculares, precisam ser repetidas devido à curta duração de seu efeito. A administração sistêmica, por sua vez, requer doses elevadas para que se tenha uma concentração intravítrea satisfatória.

Diante dessas dificuldades, vários sistemas de liberação controlada de drogas para o segmento posterior têm sido desenvolvidos (YASUKAWA et al., 2004). Os sistemas não biodegradáveis necessitam de nova cirurgia para sua remoção após o término da liberação da droga (SANBORN, 1992). As principais vantagens dos sistemas biodegradáveis são a sua alta biocompatibilidade e o fato de não apresentarem necessidade de ser retirados e, assim, proporcionarem maior adesão do paciente ao tratamento, tendo grande aplicabilidade clínica (LEWIS, 1990; KIMURA et al., 1994; HASHIZOE et al., 1994; ATHANASIOU et al., 1996; OKABE et al., 2003).

Portanto, para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho, que necessitem da manutenção de níveis terapêuticos da droga por períodos prolongados, os sistemas de liberação lenta e controlada podem ter um papel essencial (KIMURA; OGURA, 2001; YASUKAWA et al., 2001).

1.1 VIAS CONVENCIONAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS PARA O OLHO

A maioria das doenças oculares não acomete estruturas adjacentes, permanecendo restrita ao bulbo ocular durante todo o seu curso. Por isso, a administração de drogas para seu tratamento é feita, preferencialmente, por vias que garantam seu efeito local, com menor chance de ocorrência de efeitos adversos e absorção sistêmica.

1.1.1 Via Tópica

Quando a afecção acomete o segmento anterior do olho, o uso de formulações oftálmicas na forma de colírios é a opção mais indicada, como também para os casos nos quais o objetivo é a obtenção de miose, midríase ou anestesia da superfície ocular para diagnóstico, inclusive em olhos normais. A via tópica apresenta facilidade de administração e comodidade para o paciente, sendo limitada pela existência da barreira compreendida pelo epitélio corneal, pelo lacrimejamento induzido e pela perda que ocorre devido ao mecanismo de drenagem e *turnover* lacrimal (LEE; ROBINSON, 1979).

Enquanto o volume do filme lacrimal é de aproximadamente 7 μl , o volume de cada gota liberada a partir de colírios disponíveis no mercado varia entre 25 μl e 56 μl (LEDERER et al., 1986). Em olhos humanos, a produção lacrimal é de aproximadamente 2 μl por minuto; conseqüentemente, todo o seu volume é renovado a cada 2-3 minutos, e grande parte da droga instilada é removida da superfície ocular em um curto período de tempo. Estima-se que menos de 5% da dose penetre efetivamente através da córnea, atingindo os tecidos intraoculares. Em sua maior parte (50-100%), é absorvida sistemicamente pelo estroma conjuntival, vasos da margem palpebral e mucosas nasal e nasofaríngea (URTTI; SALMINEN, 1993; LEE et al., 1993). A biodisponibilidade ocular poderia ser maximizada através do aumento de sua concentração e redução do volume instilado a cada gota para 5-10 μl , o que reduziria também a absorção sistêmica (JÄRVINEN et al, 1995). O aumento da viscosidade dos colírios e o uso de pomadas oftálmicas também melhoram a absorção da droga, todavia provocam turvação visual.

O principal obstáculo à penetração das drogas através da córnea é representado pelo epitélio lipofílico (MAURICE; MISHIMA, 1984), cujo citoesqueleto apresenta *tight junctions*, mais eficazmente presentes entre as células superficiais; constituem uma barreira seletiva às moléculas pequenas e evitam a difusão de macromoléculas. Substâncias hipertônicas podem causar aumento de sua permeabilidade (MARTINEZ-PALOMO; ERLIJ, 1975). O estroma corneal é altamente hidrofílico, sendo uma barreira para a absorção ocular apenas para drogas muito lipofílicas (SCHOENWALD, 1990). É responsável pela manutenção da hidratação normal da córnea.

O papel da conjuntiva na perda sistêmica da droga é explicado, em parte, pela grande quantidade de vasos que possui e também por sua pequena espessura. Com uma área superficial de aproximadamente 18,0 cm² (a córnea possui 1,0 cm²) (WATSKY et al., 1988), a conjuntiva ainda apresenta coeficientes de permeabilidade a muitos componentes (como beta-bloqueadores) maiores do que os da córnea (AHMED et al., 1987), além de os espaços intercelulares do seu epitélio superficial (o principal obstáculo conjuntival à penetração de drogas) serem mais largos do que os espaços do epitélio corneal, o que aumenta sua permeabilidade a drogas hidrofílicas (JÄRVINEN et al., 1995). Por isso, o aumento do tempo de contato da droga com a superfície ocular nem sempre resulta em melhora significativa da absorção para o interior do olho.

1.1.2 Via periocular

A via periocular é utilizada no tratamento de várias doenças do segmento posterior do olho através de injeções subconjuntival e, principalmente, subtenoniana, sendo mais comum o uso de corticosteróides. Estudo recente mostrou a eficácia da injeção subtenoniana de triancinolona também no pós-operatório de cirurgia de catarata (PAGANELLI et al., 2004).

As características da esclera que a tornam viável à administração de drogas através de injeções perioculares são a sua grande e acessível área – compreendendo 95% da superfície ocular – seu alto grau de hidratação, permitindo a passagem de moléculas hidrofílicas, hipocelularidade com poucos sítios de ligação de proteínas e permeabilidade que não mostra declínio apreciável com a idade (FOSTER et al., 1994; OLSEN et al., 1995, 1998; EDWARDS; PRAUSNITZ, 1998; AMBATI et al., 2000).

Estudos anteriores demonstraram que a esclera é permeável a moléculas de até 70 kDa (MAURICE; POLGAR, 1977; OLSEN et al., 1995), ocorrendo efetiva penetração de drogas em vários tecidos intraoculares após serem administradas por meio de injeção subconjuntival ou subtenoniana (BARZA et al., 1977; 1978a), havendo, entretanto, grande absorção sistêmica com esses métodos. Weijtens e cols. detectaram a presença de dexametasona intravítrea após injeção peribulbar (WEIJTENS et al., 1997); essa via, porém, não é empregada na rotina terapêutica oftalmológica.

Além da idade, crioterapia e laser diodo transescleral exercem pouco efeito na permeabilidade da esclera, que é inversamente proporcional à sua espessura e ao peso molecular das substâncias. Desse modo, um paciente com esclera

mais fina, como um alto míope, apresenta maior permeabilidade do que outro com esclera mais espessa, como um hipermetrópe (OLSEN et al., 1995).

Os principais riscos relacionados às injeções perioculares são perfuração do bulbo ocular, com ou sem injeção acidental dentro do olho, fibrose dos músculos extra-oculares, ptose, reações tóxicas ao veículo da droga e herniação da gordura orbitária (HIDA et al., 1986; NUSSENBLATT, 1989; SMITH et al., 2002; GUPTA et al., 2003).

1.1.3 Via Intraocular

A liberação da droga diretamente na cavidade vítrea, em casos de doenças do segmento posterior do olho, surge diante da necessidade de se manter níveis terapêuticos adequados no seu local de ação, isto é, vítreo, retina ou coróide. Desse modo, evitam-se efeitos adversos associados ao tratamento sistêmico e problemas relacionados às vias perioculares.

Ao mesmo tempo em que representa a via mais direta para as estruturas retrolenticulares, a injeção intravítrea possui riscos inerentes ao procedimento como hemorragia intraocular, descolamento de retina, endoftalmite e catarata. Além disso, a curta meia-vida das drogas no vítreo exige, frequentemente, a repetição do procedimento, o que aumenta as chances de ocorrência de toxicidade e resulta em desconforto para o paciente, baixas tolerabilidade e adesão ao tratamento.

1.1.4 Via sistêmica

A baixa penetração dos medicamentos no interior do olho limita o número de medicações indicadas para uso em oftalmologia e exige cuidado com aquelas disponíveis por causa de seus efeitos adversos sistêmicos.

As drogas administradas sistemicamente atingem o segmento posterior do olho através da circulação sanguínea e enfrentam um obstáculo anatômico importante para o tratamento de doenças oculares: a barreira hemato-ocular, que compreende as barreiras hemato-aquosa e hemato-retiniana. A primeira é formada pelo epitélio ciliar não-pigmentado (ECNP) e pelo endotélio dos vasos irianos; a segunda, hemato-retiniana, é formada pelo EPR e pelo endotélio dos vasos retinianos (FOULDS et al., 1980; CUNHA-VAZ, 1997; 2004).

Para se aumentar a permeabilidade da barreira hemato-ocular às drogas, podem ser utilizados recursos como o uso de substâncias hipertônicas, que promovem o alargamento de *tight junctions* das células endoteliais dos vasos da retina, do EPR e do ECNP. Embora algumas alterações ultra-estruturais sejam permanentes, os efeitos fisiológicos são sempre reversíveis (LATIES; RAPOPORT, 1976; 1977). A quebra da barreira, porém, impede que se tenha uma previsão segura dos níveis intraoculares da droga, que podem ter ampla variação entre os pacientes. Além disso, os agentes hipertônicos são geralmente pouco tolerados. As características da droga também influenciam diretamente na permeabilidade, que é maior para substâncias lipofílicas ou com alta proporção óleo/água (BARZA. 1978b).

Qualquer tentativa de aplicação da via sistêmica na terapêutica ocular requer o aumento da dose administrada visando a manutenção de níveis terapêuticos intravítreos por períodos mais prolongados. Isso possibilita o surgimento de efeitos adversos, como ocorre na corticoterapia.

Desse modo, eventuais mudanças a serem feitas nas formulações das drogas para a otimização do seu uso oftalmológico devem ter como objetivo a melhora da óculo-seletividade, e não apenas da absorção ocular.

1.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

Os sistemas de liberação prolongada foram apontados como uma alternativa para melhorar a farmacocinética das drogas a partir da década de 1970. Seu objetivo é manter a concentração da droga em níveis terapêuticos por um período maior. Esse conceito, entretanto, expandiu-se para três áreas principais de aplicação: liberação prolongada de drogas administradas localmente; concentração da droga em um tecido específico após administração sistêmica; e aumento da penetração através de barreiras anatômicas naturais, como a pele, epitélio, endotélio, tecido conectivo e membranas celulares.

Recentes avanços em pesquisas clínicas e farmacológicas têm conseguido aumentar o tempo de contato da droga com a superfície ocular e melhorar sua penetração no interior do olho, principalmente para o segmento anterior, com o desenvolvimento de pomadas, géis, formulações lipossômicas e sistemas de liberação lenta (GEROSKI; EDELHAUSER, 2000). No entanto, a administração

controlada de drogas em doses terapêuticas para o segmento posterior do olho continua sendo amplamente estudada e constitui um desafio para os pesquisadores. Potencialmente, um sistema de liberação intraocular pode ser usado para o tratamento de doenças nas quais a administração local de droga é exigida repetidamente, como a retinite por citomegalovírus (CMV) e outros casos de uveítes. Além disso, tais sistemas intraoculares podem ser implantados durante a cirurgia de descolamento de retina, com o objetivo de prevenir a proliferação vítreo-retiniana (PVR), principal responsável pelo insucesso pós-operatório. Doenças crônicas sem terapêuticas satisfatórias, como a atrofia geográfica na degeneração macular relacionada à idade (DMRI), edema macular e retinose pigmentar, também podem se beneficiar desse tipo de tratamento (YASUKAWA et al., 2004).

Vários sistemas têm sido testados para superar as limitações das vias convencionais habitualmente usadas. Além de polímeros, outros produtos têm sido empregados na sua preparação. O ácido hialurônico, que é encontrado em todos os tecidos conectivos dos vertebrados e principal componente do vítreo, foi utilizado na fabricação de implantes e microesferas para uso intravítreo (PEATTIE et al., 2004; YUN et al., 2004). Sistemas de liberação prolongada com micro e nanopartículas foram preparados a partir de quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina e com estrutura similar à da celulose (AGNIHOTRI et al., 2004).

1.2.1 Tipos de sistemas utilizados em liberação prolongada

A administração de drogas pela via sistêmica, para o tratamento de órgãos-alvo, tem sido extensivamente investigada em oncologia. Em oftalmologia, é utilizada em terapia fotodinâmica para neovascularização de coróide (NVC) secundária a várias etiologias, principalmente DMRI. Teoricamente, pode ser empregada para doenças oculares nas quais a angiogênese é uma característica marcante, como retinopatia diabética, oclusão de veia central da retina (OVCR) e tumores intraoculares sólidos (YASUKAWA et al., 2004).

A rápida eliminação da superfície ocular que ocorre com as formulações tópicas, comercialmente disponíveis, pode ser evitada empregando-se carreadores coloidais de drogas. Eles têm a vantagem de poder ser utilizados na forma líquida característica dos colírios, evitando o desconforto de preparações viscosas e pomadas. Os sistemas apropriados incluem microesferas e microcápsulas, cujo tamanho é maior que $1\mu\text{m}$, e nanocápsulas, com tamanho menor que $1\mu\text{m}$ (ZIMMER; KREUTER, 1995). Vários estudos observaram o aumento da absorção e da eficácia de diversas drogas com uso desses carreadores (MARCHALHEUSSLER et al., 1991; 1992; SIRBAT et al., 2000), que ainda não recebem grandes investimentos da indústria farmacológica.

Discos de colágeno têm sido utilizados para promover a reepitelização da córnea e na liberação de drogas para o olho. Ele é moldado na forma de uma lente de contato e sua duração pode ser de até 72 horas, de acordo com as variações da matriz colágena, que podem ser conseguidas através da irradiação ultravioleta (FRIEDBERG et al., 1991). As propriedades mecânicas do disco protegem o epitélio corneal, enquanto o colágeno auxilia na cicatrização. No processo de

fabricação, o material é embalado na forma desidratada, sendo reidratado antes da aplicação. Para sua utilização como método de liberação de drogas, essa reidratação é realizada em uma solução contendo uma droga hidrossolúvel, que se associa à matriz de colágeno. À medida que o disco se dissolve na superfície ocular, ocorre a liberação da droga. Foram obtidas concentrações na córnea e no humor aquoso comparáveis à terapia tópica frequente (PHINNEY et al., 1988; HWANG et al., 1989). Resultados similares foram observados com drogas insolúveis em água como a ciclosporina (REIDY et al., 1990), incorporada ao disco durante a sua manufatura.

A iontoforese é um método também usado para promover liberação controlada de droga para o olho. Utiliza-se corrente elétrica para facilitar a penetração de drogas ionizadas pelos tecidos e o seu uso em oftalmologia requer correntes de até 2 mA (FRIEDBERG et al., 1991). O sistema, geralmente, é composto por um aplicador ocular estéril, normalmente descartável, o qual recebe a droga, e uma fonte de energia elétrica (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2004). A corrente elétrica pode ser aplicada sobre a córnea (iontoforese corneal), liberando a droga diretamente na câmara anterior, ou na pars plana (iontoforese transescleral) para que se obtenha níveis de droga no vítreo. Um estudo realizado em animais mostrou que concentrações de amicacina no humor vítreo, segmento anterior, esclera, retina e coróide, encontravam-se acima da concentração inibitória mínima e que a droga fora transportada para os tecidos oculares de maneira reprodutível e controlável através de iontoforese (VOLLMER et al., 2002). A utilização é geralmente limitada a drogas iônicas, e os riscos relacionados ao procedimento são a formação de opacidades corneais persistentes (GROSSMAN; LEE, 1989), edema e necrose tecidual (LAM et al., 1991).

As microbombas osmóticas consistem de um reservatório feito de material deformável e impermeável, circundado por um agente hiperosmótico (a membrana externa é rígida e semipermeável). Quando a bomba é colocada no ambiente aquoso, o agente osmótico hidrata-se numa taxa controlada pela permeabilidade da membrana externa e exerce pressão sobre o revestimento flexível do reservatório, liberando a droga através de um tubo (BLAIR et al., 1999). Geralmente o implante do material é feito no espaço subcutâneo. A extremidade distal do tubo pode estar localizada no saco conjuntival, estroma corneal, na câmara anterior ou na cavidade vítrea (FRIEDBERG et al., 1991). A cirurgia necessária para a sua inserção e os riscos de infecção e extrusão limitam o uso das microbombas osmóticas. Entretanto, elas permitem que se tenha um fluxo contínuo de droga, o que pode auxiliar pesquisas que tenham como objetivo investigar, por exemplo, a tolerância de determinadas estruturas oculares em exposição prolongada a drogas e toxinas, ou à cicatrização de úlceras corneais na presença constante de antibiótico.

O método de microdiálise, originalmente introduzido para a investigação de neurotransmissores no cérebro (UNGERSTEDT, 1984), foi modificado e adaptado para o uso intraocular (BEN-NUN et al., 1988; WAGA et al., 1991). Sua principal vantagem é poder ser usada tanto para a administração de drogas como para coleta de material vítreo em torno da membrana de diálise. Além disso, a administração pode ser continuamente modificada e mesmo interrompida. Uma sonda com a membrana de microdiálise na extremidade distal é inserida via pars plana, direcionada para o centro do vítreo e fixada com suturas; os tubos de conexão são posicionados sob a pele da região frontal da cabeça e na região retroauricular. Como o segmento que deve posicionar-se

na cavidade vítrea é longo, há risco de toque no cristalino, que pode levar à formação de catarata, e lesão da parede ocular oposta à da inserção (WAGA; EHINGER, 1995). O permanente acesso ao meio intraocular aumenta também a possibilidade de infecção.

As microesferas podem ser preparadas a partir dos polímeros biodegradáveis derivados do ácido láctico (PLA) e dos co-polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), sendo compostas de uma matriz polimérica contendo a droga; sua degradação ocorre por hidrólise e a taxa de liberação da droga incorporada pode ser alterada com a variação dos polímeros e da sua proporção em caso de co-polimerização e aumento do peso molecular (MORITERA et al, 1992). As microesferas poliméricas biodegradáveis têm sido estudadas como sistemas de liberação lenta para a retina e o vítreo (WADA et al, 1990; MORITERA et al, 1991; 1992) e como sistemas injetáveis em vários campos da medicina. Especificamente, microesferas de PLGA são usadas clinicamente para câncer de próstata, endometriose e outras doenças hormônio-dependentes (OKADA et al., 1991, 1996; TOGUCHI et al., 1992). Todavia, as microesferas têm como desvantagem o fato de permanecerem em suspensão no vítreo após a injeção, dificultando a visão do paciente e o exame oftalmoscópico até que ocorra sua degradação.

Os lipossomas, vesículas formadas por fosfolipídios circundando um compartimento aquoso, têm sido usados como veículo para a liberação de drogas em oftalmologia através de preparações tópicas (SCHAEFFER; KROHN, 1982), subconjuntivais (BARZA et al., 1984) e intravítreas (TREMBLAY et al., 1985). As desvantagens dos lipossomas, quando comparados às microsferas, são sua vida útil mais curta e maior custo de fabricação, além da dificuldade de preparo e baixa

estabilidade, que impedem a liberação por períodos muito prolongados. O exame da retina também é prejudicado por causa da sua presença em suspensão no vítreo. A liberação da droga pode ocorrer não somente por difusão em lipossomas intactos, mas também através de um burst após rotura da membrana lipídica (YASUKAWA et al., 2004).

Estudos demonstraram a aplicabilidade de diferentes tipos de implantes, que podem ser colocados no fórnix conjuntival (DOHLMAN et al., 1972), câmara anterior (TAN et al., 1999; THENG et al., 2003), câmara posterior (CHANG et al., 1999), região episcleral (KATO et al., 2004) ou diretamente na cavidade vítrea (CHENG et al., 1995; BERGER et al., 1996; PEARSON et al., 1996; MORITA et al., 1998; YANG et al., 1998; JAFFE et al., 2000a). Suas principais vantagens em relação a outros métodos de liberação lenta de droga para o interior do olho são sua praticidade e o fato de não interferirem na transparência dos meios oculares, principalmente quando colocados na cavidade vítrea.

1.2.2 Implantes oculares e polímeros usados na sua preparação

O sistema de liberação de droga ideal deve ser biocompatível com o organismo e, portanto, os componentes nele presentes devem ser quimicamente inertes, não-carcinogênicos, hipoalergênicos, mecanicamente estáveis e não causadores de resposta inflamatória no local de aplicação. Além disso, as características químicas e físicas do material não devem ser modificadas pelo tecido local (ATHANASIOU et al., 1996; FIALHO et al., 2003).

Polímeros biodegradáveis e não-biodegradáveis são utilizados rotineiramente no preparo de sistemas de liberação lenta de drogas. Ambos podem ser utilizados de diferentes maneiras: microesferas, micro e nanocápsulas ou dispositivos implantáveis, moldados na forma de discos, cilindros, laminas, bastões ou *plugs* (YASUKAWA et al., 2004). Os implantes podem ser produzidos de forma que a droga se encontre dispersa, homoganeamente, na matriz polimérica (sistema matricial) ou contida em um núcleo envolto por uma camada polimérica semipermeável (sistema tipo reservatório).

Os polímeros não-biodegradáveis são representados pelos derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e co-polímeros dos óxidos de etileno e propileno; necessitam de remoção após o término de liberação da droga, pois não são metabolizados ou degradados pelo organismo. Os polímeros biodegradáveis naturais, à base de proteínas, como as albuminas bovina e humana, o colágeno e a gelatina, apresentam uso restrito por conterem pureza questionável e, em alguns casos, atividade antigênica marcante. Já os sintéticos, representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliortoésteres, poliuretanos e poliacrilamidas têm apresentado

crescente interesse na aplicação como sistemas de liberação de drogas. Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli(E-caprolactona), o PLA e o PLGA. Desde que foi relatado pela primeira vez o uso do PLA como carreador biodegradável de drogas em 1970 (YOLLES et al., 1970), vários pesquisadores têm estudado a aplicação desse polímero e do PLGA em sistemas de liberação prolongada, por serem altamente biocompatíveis e não apresentarem necessidade de procedimento cirúrgico para sua retirada (KIMURA; OGURA, 2001; FIALHO et al., 2003).

O co-polímero PLGA é usado extensivamente como material sintético absorvível em fios de sutura para cirurgia oftalmológica como poliglactina 910, apresentando excelente biocompatibilidade e degradação segura (MUNTON et al., 1974). Sua utilização cirúrgica é vista também em casos de reparo de tendões (LIEM et al., 1991) e fixação óssea (KUMTA et al., 1992).

A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão, através de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando os ácidos láctico e glicólico (Figura 1). Esses ácidos são atóxicos por serem metabólitos naturais do organismo e são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (ATHANASIOU et al., 1996; FIALHO et al., 2003). O papel de atuação das enzimas na biodegradação do PLGA e PLA ainda não se encontra bem definido, embora a literatura afirme que esse processo não envolve atividade enzimática, mas somente hidrólise (JAIN, 2000).

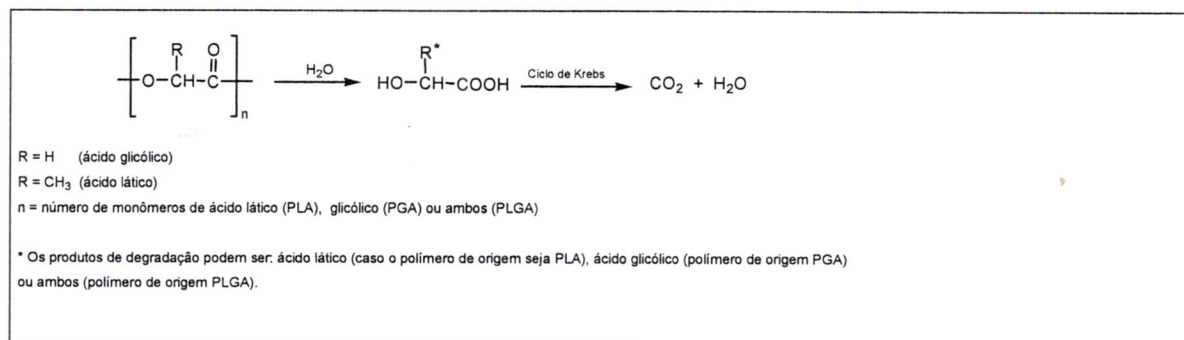


Figura 1 – Mecanismo de hidrólise de PLA, PGA ou PLGA (Adaptado de MERKLI et al., 1998).

O PLA apresenta uma maior hidrofobicidade quando comparado ao polímero derivado do ácido glicólico (PGA) por causa da presença do grupo metila (CH₃). O PGA, portanto, por ser bastante sensível à hidrólise, não é adequado para a utilização como sistemas de liberação de drogas e os implantes de PLA, por outro lado, apresentam período de latência muito prolongado (KUNOU et al., 1995). A utilização do co-polímero PLGA é preferida em relação ao uso dos polímeros isoladamente, pois o mesmo apresenta como principal vantagem a possibilidade de controlar a sua hidrofobicidade, o que é feito a partir da manipulação da proporção de ácido láctico, isto é, quanto maior essa proporção, menor a velocidade de degradação, já que a absorção de água será menor (KIMURA; OGURA, 2001). A degradação do PLGA pode ser influenciada, ainda, por fatores como o peso molecular, cuja redução acelera a degradação, a carga total de droga da matriz polimérica e a área total da superfície do implante que apresentam relação direta com a liberação da droga (YASUKAWA et al., 2001).

A realização de vitrectomia também altera o perfil de liberação de drogas a partir de implantes poliméricos quando comparada com olhos normais. A remoção cirúrgica do vítreo faz com que sua cavidade seja preenchida por um líquido de

baixa viscosidade, que facilita o turnover de água no seu interior. Morita e cols., em um estudo com coelhos, observaram que a liberação de dexametasona, a partir de um implante biodegradável de PLA, foi consideravelmente mais rápida nos olhos vitrectomizados do que naqueles normais, e atribuíram esse fato às diferenças que ocorrem em processos como a penetração de água no implante, dissolução da droga e sua liberação no humor vítreo entre os dois tipos de olhos (MORITA et al., 1998). Observaram, ainda, que a maior velocidade de clearance nos olhos vitrectomizados pode refletir a perda da função de barreira do vítreo anterior (membrana hialóide anterior), com consequente aumento da drenagem aquosa e do transporte para o espaço sub-retiniano.

Atualmente, dois implantes não-biodegradáveis de liberação lenta são aprovados para uso clínico nos Estados Unidos da América (EUA): Ocusert e (Alza, EUA) e Vitrasert® (Bausch & Lomb, EUA). Trata-se o primeiro de um dispositivo conjuntival que libera pilocarpina; o segundo se refere a um implante intravítreo contendo ganciclovir que tem sido usado em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) para o tratamento de retinite por CMV. Sua inserção é feita via pars plana e permanece no olho ao término da droga se não for removido cirurgicamente (SANBORN et al., 1992; SMITH et al., 1992). Ambos utilizam uma membrana polimérica não-biodegradável. Outros dois estudos nos quais são empregados corticosteróides estão em fase III também nos EUA, um deles com um implante intravítreo biodegradável de PLGA contendo dexametasona (Posurdex®; Allergan, EUA), e o outro não-biodegradável de álcool polivinílico (PVA) e acetato etileno-vinílico (EVA) contendo fluocinolona (Retisert®; Bausch & Lomb, EUA).

Quando comparados a outros sistemas de liberação lenta que utilizam a via transescleral, os implantes intravítreos apresentam como vantagem a cinética

mais previsível, pois a difusão da droga ocorre diretamente para o vítreo, sendo menos afetada pela espessura escleral. Além disso, a influência de características físicas e químicas da droga, como peso molecular e solubilidade em água, é menor, fator que aumenta o número de drogas que podem ser utilizadas.

1.2.3 Desvantagens

Algumas desvantagens dos sistemas de liberação prolongada incluem sua incapacidade de tratar o olho contralateral, bem como a doença extra-ocular em casos de etiologia infecciosa, como a retinite por CMV, ou inflamatória, como as doenças de Behçet e Vogt-Koyanagi-Harada e sarcoidose, que é também uma característica de outras vias de administração comumente usadas. Ainda, há a necessidade de procedimento cirúrgico para sua colocação e, apesar de garantirem níveis intraoculares mais elevados da droga, exigem cuidado para que não ocorra toxicidade ocular (VELEZ et al., 1999).

Os implantes intravítreos, ao exigirem a perfuração dos olhos para sua colocação, aumentam as chances de complicações associadas aos procedimentos oftalmológicos invasivos, como endoftalmite, hemorragia e descolamento de retina. A toxicidade tecidual pode, ainda, ser mais facilmente atingida pois a liberação dá-se no interior do vítreo. Os sistemas que utilizam a via transescleral para atingir o segmento posterior do olho oferecem menores riscos de complicações graves, apesar de apresentarem menor previsibilidade quanto à concentração intravítrea obtida já que as características físico-químicas

da droga e as variações anatômicas individuais exercem maior influência na sua penetração intraocular.

1.3 CORTICOSTERÓIDES

A atividade antiinflamatória do cortisol (hidrocortisona), o hormônio produzido no córtex das glândulas adrenais humanas, foi descoberta na década de 1940, e vários de seus derivados sintéticos têm se mostrado úteis no controle de processos inflamatórios e auto-imunes. A introdução dos corticosteróides como método terapêutico em doenças oculares ocorreu há mais de 50 anos (GORDON; McLEAN, 1951). Essas drogas têm sido largamente empregadas tanto no tratamento de alterações inflamatórias do segmento anterior quanto do segmento posterior do olho, reduzindo as consequências da sua resposta, particularmente a cicatrização e neovascularização (DUKE-ELDER; ASHTON, 1951; LEIBOWITZ; KUPFERMAN, 1980). O seu efeito parece ser inespecífico e sua ação pode ser percebida em processos de causa alérgica, traumática ou infecciosa. Clinicamente, os corticóides não atuam de forma direta para corrigir uma desordem específica, mas provavelmente modificam uma resposta do organismo a um estímulo exógeno ou endógeno (CHARAP, 1992).

Evidências indicam que a ação farmacológica dos corticosteróides ocorre através de proteínas receptoras (FRANGIE; LEIBOWITZ, 1993) resultando em alterações no sistema imunológico, em quase todos os seus aspectos (CHARAP, 1992). Há inibição da migração de neutrófilos para o espaço extracelular e sua

aderência no endotélio vascular no local de lesão tecidual. Em doses terapêuticas, os corticosteróides também inibem a migração de macrófagos, interferem na atividade dos linfocítica e reduzem o número de linfócitos T e B (LEIBOWITZ; KUPFERMAN, 1980). Outras células e substâncias moduladoras da resposta inflamatória têm seu comportamento modificado por essas drogas como os basófilos, que inibem a liberação de histamina induzida por estímulo dependente de IgE (SCHLEIMER, 1985); a fosfolipase A2 ao ser inibida evita a biossíntese do ácido aracdônico e a consequente formação de prostaciclina, tromboxano A, prostaglandinas e leucotrienos (CHARAP, 1992). Os corticosteróides também diminuem a permeabilidade capilar, a proliferação de fibroblastos e a quantidade de depósito de colágeno, o que influencia na reparação dos tecidos (LEOPOLD et al., 1951).

Na oftalmologia os corticosteróides são usados para tratar diversas patologias, sendo especialmente indicados para reduzir processos inflamatórios e alérgicos de doenças oculares e no pós-operatório, principalmente através da via tópica. Porém, ao mesmo tempo em que são úteis no controle inflamatório da maioria das afecções superficiais do olho, podem melhorar os sintomas e mascarar a progressão de doenças de etiologia fúngica ou herpética, por exemplo, levando à perda da visão. Além disso, não devem ser utilizados em casos de lacerações e abrasões mecânicas do olho, pois retardam a cicatrização e estimulam a disseminação de infecções. Outras complicações oculares que podem surgir são úlceras corneais, glaucoma cortisônico (mais comum com a terapia tópica) e catarata subcapsular posterior, que é mais frequente com o tratamento sistêmico por período superior a um ano. A corticoterapia sistêmica é comumente utilizada em casos de uveíte e neurite óptica, por exemplo, e

em pacientes cujo quadro oftalmológico manifesta-se associado a processos inflamatórios extra-oculares. De qualquer modo, podem surgir efeitos adversos gerais como hipertensão arterial sistêmica, hiperglicemia, maior susceptibilidade a infecções, úlceras pépticas e psicose quando o tratamento torna-se crônico (HAYNES-JR; MURAD, 1990). O uso de corticosteróides deve, então, ser feito apenas quando sua indicação for indispensável e seus efeitos adversos oculares e sistêmicos devem ser conhecidos e detectados precocemente.

A escolha do corticosteróide a ser empregado varia de acordo com a enfermidade ocular presente e sua dose deve ser ajustada individualmente. Para uso local as drogas mais utilizadas clinicamente são a prednisolona, a dexametasona e a betametasona. Para uso sistêmico opta-se geralmente pela prednisona e metilprednisolona, enquanto a triancinolona é preferida para aplicação intra ou periocular. A tabela 1 mostra a potência relativa e a dose equivalente dos corticosteróides.

Tabela 1 – Potência relativa e dose equivalente dos corticosteróides (Adaptado de HAYNES-JR; MURAD, 1990)

CORTICOSTERÓIDE	POTÊNCIA RELATIVA	DOSE EQUIVALENTE (mg)
Cortisol	1	20
Cortisona	0.8	25
Prednisona	4	5
Prednisolona	4	5
Metilprednisolona	5	4
Triancinolona	5	4
Betametasona	25	0.75
Dexametasona	25	0.75

O acetato de dexametasona, derivado da dexametasona encontra-se como um pó cristalino, branco e inodoro. É uma substância praticamente insolúvel em água; pouco solúvel em acetona, álcool etílico, dioxano e metanol, e ligeiramente solúvel em clorofórmio e diclorometano (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2004 – USP 27, 2004). O peso molecular da dexametasona é 392,5 g/mol (EINMAHL et al., 1999).

A dexametasona é um corticóide que apresenta, principalmente, atividade glicocorticóide. Portanto, esta droga tem a capacidade de reduzir acentuadamente as manifestações da inflamação, devido aos efeitos profundos que exerce sobre a concentração, distribuição e função dos leucócitos periféricos, e de inibir a atividade da fosfolipase A_2 . Ela apresenta uma potência antiinflamatória superior a outros corticóides, de forma que 750 µg de dexametasona é equivalente à atividade antiinflamatória de 5 mg de prednisolona (HAYNES-JR; MURAD, 1990).

O uso oftalmológico da dexametasona teve início em 1959 e desde então tornou-se uma das drogas mais usadas no tratamento das inflamações oculares, devido à sua segurança e potência antiinflamatória (LEOPOLD, 1958). A dexametasona e seus derivados são considerados drogas de grande eficácia no tratamento de inflamações oculares (LEOPOLD, 1958). Ela pode ser usada para o tratamento de doenças oculares tanto na forma de um álcool livre como nas formas esterificadas (por exemplo, o acetato de dexametasona), sendo que a concentração deve ser expressa em termos de dexametasona. Teoricamente, em forma de sistemas carreadores, estas propriedades podem ser amplamente otimizadas e potencializadas.

1.4 APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS DOS CORTICOSTERÓIDES EM DOENÇAS DO SEGMENTO POSTERIOR DO OLHO

Os corticosteróides são usados, tradicionalmente, por causa de sua capacidade de diminuir a migração de leucócitos, limitando seu acesso aos locais de inflamação, e de redução da produção de citocinas. Para se obter esses efeitos no segmento posterior do olho a única alternativa foi, por muito tempo, a via sistêmica. Recentemente, tornou-se frequente o uso de injeções perioculares e intravítreas de corticosteróides, principalmente triancinolona, para o tratamento de algumas doenças retinianas como NVC, telangiectasias justafoveais idiopáticas, retinopatia diabética proliferativa, edema macular secundário a diabetes mellitus, OVCR, uveítes, pseudofacia e para a visibilização intra-operatória da hialóide posterior (PEYMAN; MOSHFEGHI, 2004).

Alguns estudos mostraram a eficácia terapêutica da injeção intravítrea de 4 mg de triancinolona na melhora da acuidade visual (AV) e estabilização angiográfica da NVC em pacientes com DMRI exsudativa (CHALLA et al., 1998; DANIS et al., 2000), assim como na resolução do edema macular diabético e normalização da espessura retiniana foveal (MARTIDIS et al., 2004). As principais hipóteses relacionadas ao mecanismo de ação dos corticosteróides na retina são a inibição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), restabelecimento da barreira hemato-retiniana através da redução da permeabilidade e efeito antiangiogênico (FLOMAN; ZOR, 1977; ISHIBASHI et al., 1985). O VEGF, uma citocina angiogênica e um fator de permeabilidade é secretado a partir das células gliais, células do EPR e endotélio vascular; está presente na retina e no vítreo em baixos níveis (BUDDI; ELIOTT, 2004). É possível que essa expressão do VEGF pelo EPR normal seja responsável, ao menos parcialmente, pelo efeito trófico do epitélio sobre a coriocapilar (BLAAUWGEERS et al., 1999). Acredita-se, ainda, que haja um equilíbrio natural entre o VEGF e o fator derivado do EPR, uma citocina antiangiogênica, e que uma alteração nesse equilíbrio seja responsável pela angiogênese coroidal que leva ao crescimento de vasos sanguíneos anormais no espaço sub-retiniano e/ou sub-EPR, caracterizando a NVC (OHNO-MATSUI et al., 2001). Uma maior expressão do VEGF provoca também aumento da permeabilidade vascular, responsável pelo surgimento de edema retiniano, e promove migração e proliferação de células endoteliais, etapas essenciais para a neovascularização da retina. Assim, o VEGF é reconhecido como alvo terapêutico promissor para a regulação da angiogênese (WITMER et al., 2003), e as consequências de sua inibição têm sido estudadas através de corticóides tradicionais e de novas drogas angiostáticas como o Macugen® (Pfiser/

Eyetech, EUA) que bloqueia a isoforma VEGF 165 e foi recentemente aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para uso em pacientes com DMRI exsudativa; Lucentis® (Novartis/Genentech, EUA), o fragmento ativo de um anticorpo recombinante humanizado para o VEGF, e Anecortave® (Alcon, EUA), um corticosteróide sintético modificado sem ação glucocorticóide e que não causa aumento da pressão ocular. Os dois primeiros são injetados diretamente na cavidade vítrea, enquanto o último é administrado através de injeção periorbital (SINGERMAN; MILLER, 2003).

Outras substâncias atuam sinergicamente com o VEGF na angiogênese, como o fator derivado de células estromais-1 (SDF-1). O SDF-1 é a principal quimiocina que mobiliza as células-tronco hematopoéticas (HSC), que têm função hemangioblástica, e as células progenitoras endoteliais (EPC) para os locais onde há dano vascular (HATTORI et al., 2003). Sabe-se que a expressão do SDF-1 aumenta em olhos nos quais estão presentes afecções como edema macular e retinopatia diabética proliferativa, além de correlacionar-se diretamente com a gravidade da doença (BUTLER et al., 2005). Um dos mecanismos de ação dos corticosteróides na resolução do edema macular diabético após a injeção intravítrea seria também a redução dos níveis de substâncias como o SDF-1 e do subsequente recrutamento de EPC, o que, teoricamente, provoca regressão de neovascularização (BUTLER et al., 2005).

Estudos indicam que os corticóides atuam, ainda, nas junções intercelulares, modulando a expressão de algumas moléculas de adesão e permeabilidade na retina como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). A ICAM-1 é expressa constitucionalmente no EPR e nas células endoteliais dos vasos da coróide, sendo um componente importante para as interações intercelulares durante a resposta

inflamatória, mediando a adesão e o extravasamento de leucócitos. Penfold e cols. demonstraram que a triancinolona é capaz de reduzir a expressão de ICAM-1, após estudo com um modelo de barreira hemato-retiniana externa. Os autores sugerem que o mesmo pode ocorrer in vivo e as consequentes reduções da permeabilidade vascular e de estímulos inflamatórios seriam, então, os principais efeitos da injeção intravítrea de triancinolona (PENFOLD et al., 2000). Anteriormente, Singer e cols. evidenciaram, in vitro, que a dexametasona pode regular a permeabilidade através de sua ação sobre *tight junctions*, resultando no aumento da resistência transepitelial e da *zonulae occludens-1* (ZO-1), uma proteína de membrana que participa das junções intercelulares (SINGER et al., 1994).

Vários autores têm estudado as propriedades terapêuticas dos corticosteróides avaliando seus efeitos através de sistemas de liberação lenta de drogas para o segmento posterior do olho (CIULLA et al., 2004). Cheng e cols. mostraram a eficácia de um implante intravítreo não-biodegradável contendo dexametasona em um modelo experimental de uveíte em coelhos, controlando a inflamação aguda e diminuindo a incidência e a gravidade de complicações crônicas. Os olhos tratados apresentaram vítreo claro, retina com aspectos clínico e histopatológico normais e ausência de alteração no eletrorretinograma (ERG) (CHENG et al., 1995). Posteriormente, esse implante foi utilizado em um dos olhos de paciente portadora de esclerose múltipla e iridociclite granulomatosa recorrente bilateral e uveíte intermediária (o implante foi colocado após a realização de vitrectomia). Não houve recorrência da inflamação por aproximadamente dez meses (ao contrário do olho contralateral), o que permitiu a suspensão do tratamento tópico com corticosteróides (JAFFE et al., 2000b).

Nos EUA, os estudos fase II com o implante Posurdex® incluíram 306 pacientes com edema macular persistente por pelo menos 90 dias, secundário a retinopatia diabética, OVCR, síndrome de Irvine-Gass ou uveíte. Os pacientes foram divididos em três grupos e receberam implantes contendo 350 µg ou 700 µg de dexametasona ou foram observados. Após 90 dias, os olhos que receberam implantes contendo 700 µg apresentaram melhora estatisticamente significativa de duas linhas na AV quando comparada àqueles não tratados. Esse efeito persistiu por 180 dias, apesar de a duração do implante ter sido de aproximadamente 6 a 8 semanas. A melhora da AV ocorreu também nos pacientes tratados com a dose de 350 µg. Houve, ainda, melhora significativa da espessura retiniana avaliada com tomografia de coerência óptica (OCT) e do vazamento de contraste no exame de angiofluoresceinografia (AF) em ambos os grupos nos quais foram colocados os implantes (BUDDI; ELIOTT, 2004).

O implante Retisert®, contendo fluocinolona, é capaz de liberar a droga por aproximadamente 2,5 anos e após sua inserção na cavidade vítrea via pars plana, permanece fixo à esclera através de uma sutura (JAFFE et al., 2000a). Os estudos avaliam pacientes portadores de uveíte posterior de etiologia não-infecciosa e edema macular diabético. O objetivo principal do estudo fase III em pacientes com *uveíte posterior* foi avaliar a taxa de recorrência da doença. O implante foi colocado em um olho nos casos de uveíte unilateral ou naquele mais gravemente afetado em casos de acometimento bilateral, com doses de 0,5 mg e 2,0 mg de fluocinolona. Foram avaliados 239 pacientes e os resultados obtidos até a 34ª semana divulgados, mostrando que a taxa de recorrência foi estatisticamente mais baixa nos olhos com o Retisert® (10,0%) do que nos olhos contralaterais (55,7%) e que houve melhora significativa da AV naqueles que receberam o implante. Além

disso, observou-se redução estatisticamente significativa da necessidade de uso de corticosteróides sistêmicos ou de agentes imunossupressores, de injeções perioculares e de esteróides tópicos para controle da inflamação dos olhos com implante. Esses pacientes também apresentaram catarata e aumento da pressão ocular, após 34 semanas (BAUSCH & LOMB, 2004). O implante Retisert contendo 0,5 mg de fluocinolona foi aprovado recentemente nos EUA pelo FDA para casos de uveíte posterior crônica não-infecciosa.

No estudo fase III do Retisert® em oitenta pacientes portadores de edema macular diabético, foram utilizados inicialmente implantes contendo 0,5 mg ou 2,0 mg de fluocinolona, mas os primeiros resultados não mostraram vantagem do implante com 2,0 mg de droga e o mesmo foi descontinuado. Um grupo de pacientes recebeu os implantes intravítreos nos olhos acometidos (n=41) e outro foi observado (n=28), sendo que em alguns casos do grupo controle foi realizada fotocoagulação da retina (grid macular). Os resultados divulgados após dois anos do estudo fase III revelaram que houve melhora estatisticamente significativa na regressão total do edema foveal e na AV nos olhos com o implante em relação àqueles do grupo controle. Porém, houve maior incidência de catarata (77,4% versus 13,3%) e aumento da pressão ocular (31,7% versus 0,0%) no grupo tratado com Retisert®, quando comparado ao controle (BUDDI; ELIOTT, 2004).

O relato de toxicidade retiniana provocada pelos veículos de alguns corticosteróides de depósito após injeção intravítrea (HIDA et al., 1986) reforça a importância de estudos de sistemas de liberação de drogas como este, visando a sua aplicação clínica. A administração prolongada de corticosteróides para o segmento posterior do olho assumirá importante papel na prevenção de algumas condições, como PVR, e no tratamento de outras doenças prevalentes na

população em geral, como uveítes, retinopatia diabética e DMRI, complicadas com edema ou neovascularização. Muitos casos de uveítes crônicas podem se beneficiar da menor incidência de efeitos adversos sistêmicos dos corticosteróides em sistemas de liberação, que podem também reduzir as indicações dos agentes imunossupressores que atualmente são empregados na suspensão ou diminuição da dose de esteróides em uso por esses pacientes.

1.5 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O presente estudo é pioneiro no Brasil no uso de implantes de liberação lenta de corticosteróides e representa o primeiro passo para a realização de testes clínicos desta tecnologia em pacientes brasileiros com doenças inflamatórias do segmento posterior do olho. A nacionalização desta tecnologia pode favorecer inúmeras pesquisas no campo da oftalmologia, propiciando o barateamento desses sistemas no mercado nacional, quando aprovada para uso clínico.

OBJETIVOS

Objetiva o presente estudo:

- 2.1** Avaliar o perfil de liberação intravítrea de dexametasona a partir de um implante biodegradável de PLGA, em olhos de coelhos.
- 2.2** Avaliar a ocorrência de possível toxicidade retiniana causada pela dexametasona ou pela presença do polímero biodegradável na cavidade vítrea, através de eletrorretinografia e estudo histopatológico.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES

3.1.1 Materiais

Na preparação dos implantes, foram utilizados acetato de dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA), acetonitrila e metanol grau CLAE (EM Science, Merck KgaA, Alemanha) e co-polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) 50:50 (PLGA 50:50) (Resomer® RG 505, Boehringer Ingelheim, Alemanha). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2 Obtenção dos implantes biodegradáveis

Os implantes foram desenvolvidos por pesquisadores do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), seguindo a técnica descrita por Fialho e Silva-Cunha. Uma mistura homogênea de pós do polímero e do acetato de dexametasona foi utilizada para a obtenção dos implantes pelo método de moldagem a quente. Foram preparados sob fluxo laminar, em ambiente estéril (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2005).

No estudo utilizaram-se implantes de PLGA 50:50 com e sem dexametasona na sua composição. Os primeiros continham 25% p/p de dexametasona base livre, $4,0 \pm 0,1$ mm de comprimento, $1,0 \pm 0,1$ mm de diâmetro e peso médio de 4,3 mg. Aqueles nos quais não foi adicionada a droga apresentavam as mesmas características físicas descritas (figura 2).

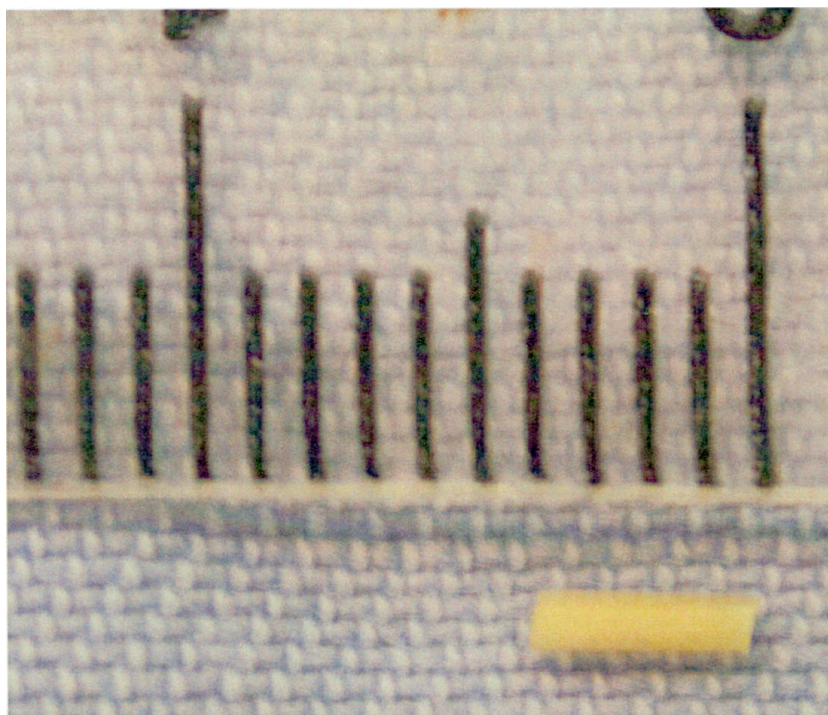


Figura 2 – Implante utilizado nas cirurgias (graduação em milímetros).

3.2 ANIMAIS

Sessenta coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), machos, com idade média de quatro meses e peso de 2000 g a 2500 g, foram utilizados no estudo, de acordo com a resolução da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para o uso de animais em pesquisa. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). As cirurgias para a colocação dos implantes foram realizadas no Hospital Veterinário Dr. Halim Atique da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Rio Preto (UNIRP), em São José do Rio Preto, cujo biotério abrigou os animais durante todo o período de estudo.

Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo I era composto por 38 animais que receberam um implante em seu olho direito contendo 1,0 mg de dexametasona. O grupo II (grupo controle) estava formado por 22 animais nos quais foi colocado um implante também no olho direito, mas que continha apenas o co-polímero PLGA, sem a droga. Foram utilizados 48 animais para o estudo da dosagem de dexametasona intravítrea, sendo escolhidos aleatoriamente 32 animais do grupo I e 16 do grupo II.

As análises do vítreo realizaram-se após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 semanas da cirurgia, quando os animais de ambos os grupos foram sacrificados. No grupo I, as dosagens da droga foram realizadas em quatro animais a cada semana e no grupo II, dois animais foram sacrificados semanalmente para a dosagem da droga. Devido às complicações eventuais previstas, que pudessem causar a morte ou a exclusão de alguns animais após a cirurgia (descritas a seguir), considerou-se a

possibilidade de redução da amostra inicial, destinada à dosagem da droga, de até 20%. Assim, foram operados 40 animais no grupo I (resultando na disponibilidade de 5 animais para cada semana até a oitava semana) e, a cada semana, 4 eram escolhidos aleatoriamente até o total necessário de 32 coelhos para a dosagem da dexametasona. Os oito animais restantes desse grupo não foram considerados na análise estatística do estudo. No estudo de toxicidade, a histopatologia foi realizada após 8 semanas, em 2 coelhos, tendo sido escolhidos aleatoriamente seis de cada grupo. Vinte e quatro horas antes da cirurgia para a colocação do implante e na oitava semana após a colocação do mesmo, os seis animais do grupo I foram submetidos ao ERG. Após o ERG da oitava semana, os 12 coelhos foram sacrificados e seus olhos direitos, enucleados e processados para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, como descrito a seguir.

Os animais foram operados no centro cirúrgico do Hospital Veterinário, sob cuidados de antissepsia e com medidas pós-operatórias para evitar complicações imediatas (figuras 3 e 4). As cirurgias para a colocação do implante e a posterior eutanásia dos animais foram acompanhadas pelo médico veterinário responsável pela administração das drogas anestésicas (figura 5).

Os coelhos ficaram confinados em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura média de 25 °C, com ar condicionado e exaustor de ar (figura 6), e luminosidade variando de acordo com a luz solar. Não houve restrição de água nem de alimentação (ração animal própria para a espécie).

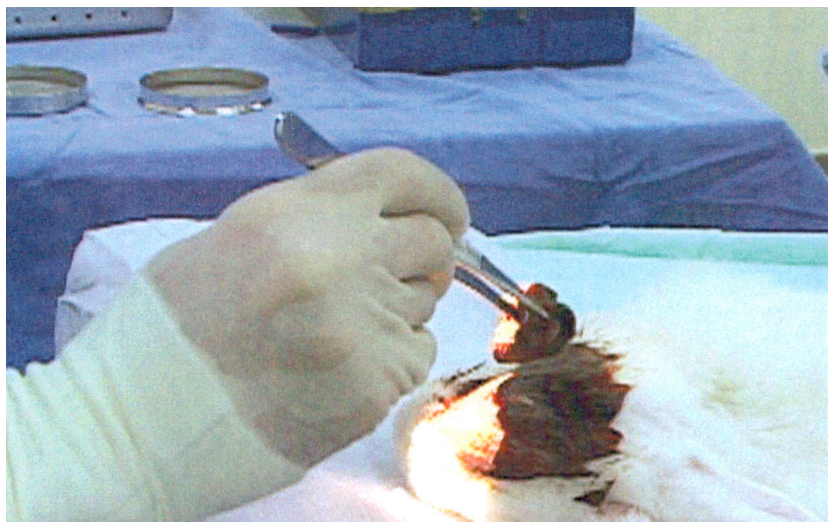


Figura 3 – Antissepsia pré-operatória periocular direita.



Figura 4 – Animais no pós-operatório imediato, sob efeito da anestesia.



Figura 5 – Cirurgia para a colocação do implante acompanhada por médico veterinário.



Figura 6 – Ambiente no qual os animais foram mantidos durante o estudo.

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

A anestesia foi realizada utilizando-se uma injeção intramuscular de 30 mg/kg de cloridrato de ketamina (Ketamin[®], Cristália - 50 mg/ml) e 4,0 mg/Kg de xilasina (Coopazine[®], Schering-Plough Coopers – 20 mg/mi), além da instilação tópica de proximetacaína 0,5% (Anestalcon[®], Alcon). Procedeu-se, no olho direito, a uma peritomia de 5 mm, no quadrante temporal superior, e a uma esclerotomia a 2 mm do limbo, por meio da qual o implante foi inserido e posicionado sem suturas (figuras 7 e 8). A esclera e a conjuntiva foram suturadas com fio absorvível (Vicryl[®] 7.0, Johnson & Johnson) e foi instilado colírio de ofloxacino 0,3% (Oflox[®], Alcon), a partir do pós-operatório imediato, quatro vezes ao dia durante cinco dias (figura 9).

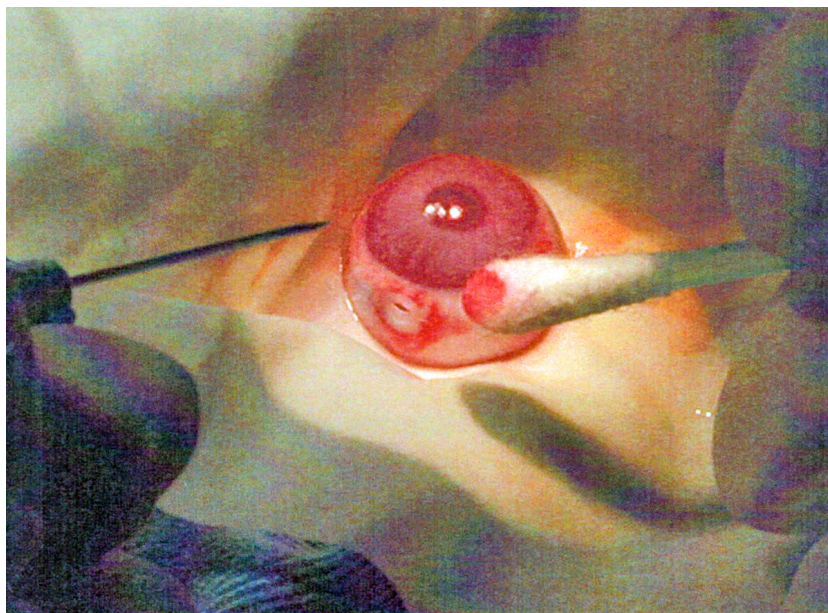


Figura 7 – Esclerotomia pela qual o implante foi inserido.

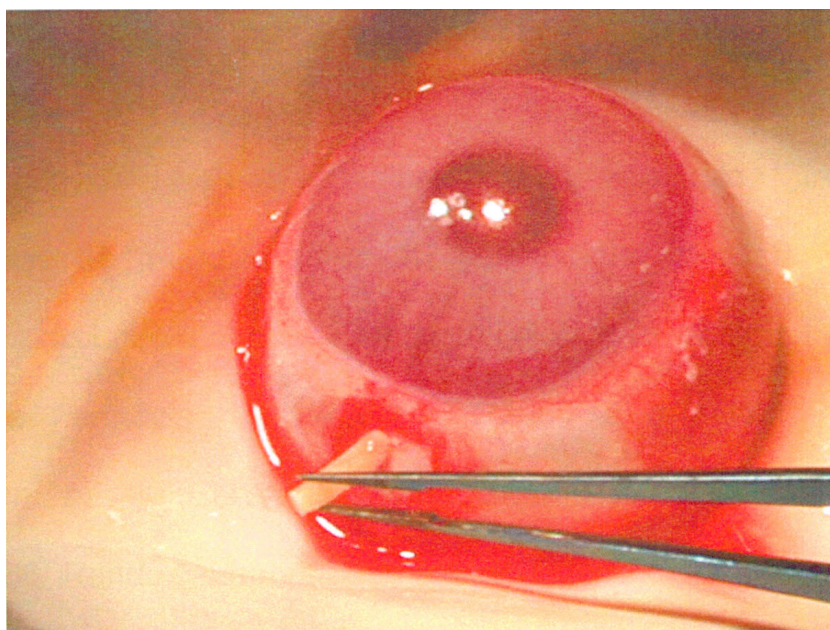


Figura 8 – Colocação do implante através da esclerotomia.

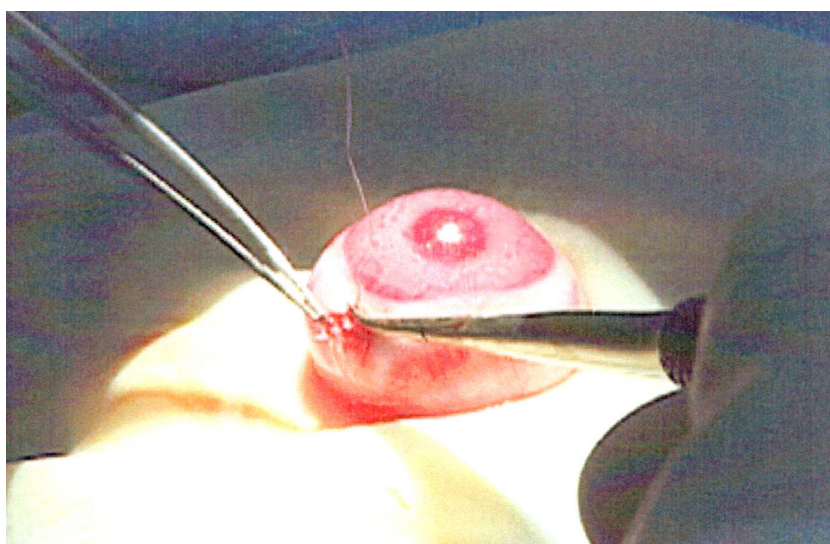


Figura 9 – Sutura da esclerotomia após a colocação do implante.

3.4 DOSAGEM DE DEXAMETASONA INTRAVÍTREA

A dosagem da dexametasona liberada para a cavidade vítrea foi realizada em 32 animais do grupo I e em 16 animais do grupo II (48 olhos), por pesquisadores do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Empregou-se o método enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), utilizando-se um kit comercial (Corticosteroid Elisa, DM 2156, Randox® Laboratories Ltd., Inglaterra). Um fotômetro (MultiskanV MS, Titertek, EUA) foi usado para a leitura das placas.

Para a avaliação do perfil de liberação da droga, os coelhos do grupo I e do grupo II foram sacrificados a cada semana, durante oito semanas consecutivas, com dose letal de tiopental sódico intravenoso (Thiopentax®, Cristália), 100 mg/Kg. Em seguida, foram os animais decapitados e os olhos que receberam os implantes, imediatamente enucleados; o vítreo foi completamente retirado e, logo a seguir, conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação da concentração de dexametasona intravítrea pelo método ELISA.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas à análise sem pré-tratamento, de acordo com as instruções do fabricante. O vítreo foi usado em duplicata após a homogeneização. A quantidade de droga foi expressa como concentração equivalente de dexametasona, em ng/ml de vítreo.

3.5 ESTUDO DE TOXICIDADE RETINIANA

3.5.1 Observação clínica

Desconhecendo a que grupo pertenciam os animais, dois examinadores realizaram os exames de inspeção e oftalmoscopia binocular indireta (Topcon®, Japão) em todos os animais. Esses exames foram feitos no pré-operatório e, semanalmente, após o procedimento cirúrgico para a colocação do implante, até a oitava semana. Os seguintes dados clínicos foram pesquisados: quemose, hiperemia ou secreção conjuntival, edema de córnea, hipópio, catarata, opacidade vítrea e descolamento de retina. Para a dilatação pupilar foram utilizados tropicamida 0,5% e fenilefrina 2,5% tópicos.

Quatro animais participantes do estudo até a oitava semana, pertencentes a cada um dos grupos, foram submetidos ao exame de tonometria de aplanção. As medidas foram realizadas nestes coelhos antes da cirurgia e após uma, quatro e oito semanas, através de TonoPen® (Mentor, EUA); o valor da pressão ocular considerado para cada olho avaliado foi a média de três aferições.

3.5.2 Eletrorretinografia

A função retiniana foi avaliada através de ERG (LKC, EPIC 2000), de acordo com o protocolo da *International Society of Electrophysiology of Vision*

ISCEV). Foi realizado com estímulo tipo flash, utilizando-se uma cúpula de Ganzfeld. O exame foi dividido em duas fases: fase 1 ou escotópica (adaptação ao escuro durante 30 minutos), na qual foram estudados os bastonetes, e fase 2 ou fotópica (adaptação à luz durante 10 minutos), quando se estudaram os cones. Na primeira fase foram realizados os passos escotópico B, resposta máxima combinada e potenciais oscilatórios, e na segunda, os passos fotópico B e *flicker* (30 Hz). Seis coelhos do grupo I, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos a exame de eletrorretinografia imediatamente antes da cirurgia e na oitava semana, quando foram sacrificados. Os animais foram submetidos ao ERG sob anestesia com ketamina e xilasina, e anestesia tópica com cloridrato de proximetacaína 0,5%.

3.5.3 Estudo histopatológico

No estudo histopatológico, realizado após 8 semanas, foram utilizados 12 coelhos, incluindo-se os seis do grupo I previamente submetidos ao ERG, e seis animais do grupo II. Os olhos experimentais desses animais foram analisados com o microscópio de luz, e seis deles (três de cada grupo) foram preparados para exame com microscopia eletrônica de transmissão.

Os coelhos foram sacrificados com dose letal de tiopental sódico intravenoso (Thiopentax®, Cristália) e, em seguida, decapitados. Os olhos que receberam os implantes nos dois grupos foram imediatamente enucleados, livrados dos tecidos adjacentes e colocados em solução fixadora (figuras 10 e 11).



Figura 10 – Preparo dos olhos experimentais para o estudo histopatológico.



Figura 11 – Olho experimental enucleado, livre dos tecidos adjacentes.

A solução fixadora empregada para a preparação do exame com microscopia de luz foi o formaldeído 4% (recentemente preparado a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato de Sorensen 0,1 M, pH 7,2. Uma calota posterior do globo ocular foi separada através de uma incisão equatorial ao nível da inserção dos músculos retos e, então, dividida em duas partes por um corte horizontal passando pelo nervo óptico, permanecendo no fixador por 24 horas, a 4 °C. Em seguida, as peças foram incluídas rotineiramente em parafina. Dos blocos, foram produzidos 12 cortes de 5 µm de espessura, em micrótomo Reichert-Jung, modelo RM 2065 (Leica Instruments®, Alemanha). Os cortes corados em hematoxilina e eosina foram observados com o microscópio de luz (Carl Zeiss®, Alemanha) e imagens representativas da retina, fotografadas utilizando-se o fotomicroscópio Axiophot (Carl Zeiss®, Alemanha).

Os seis olhos inicialmente destinados à microscopia eletrônica de transmissão tiveram o segmento posterior recortado do restante do globo ocular e dividido em duas peças por um corte horizontal passando pelo nervo óptico. As peças foram, então, imersas em solução de formaldeído 2% e glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, durante quatro horas, a 4°C. Após lavagem em tampão durante 30 minutos, fragmentos desses segmentos, com aproximadamente 1,0 mm de espessura, foram refixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1,0% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por duas horas, a 4°C, e desidratados com uma série crescente de etanóis. Os fragmentos de retina foram, então, tratados com óxido de propileno e incluídos em Epon 812. Dezoito cortes semifinos de 0,5 µm obtidos com ultramicrótomo Reichert Ultracut S (Leica Instruments®, Alemanha) foram colhidos em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina 1,0% e analisados com microscópio de luz (Carl Zeiss®,

Alemanha). A partir desses cortes, foram obtidos registros fotográficos de imagens representativas da retina, utilizando-se o fotomicroscópio Axiophot. Seis blocos foram selecionados, sendo os seus cortes finos avaliados por meio de microscopia eletrônica de transmissão (Philips®, EM 208, EUA), após contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo considerou uma amostra de 60 coelhos (unidade experimental), nos quais foram colocados implantes e sacrificados ao longo de oito semanas. A cada semana foram sacrificadas quatro unidades e as concentrações de dexametasona intravítrea, determinadas, em ng/ml. Nessa análise estatística descritiva e exploratória, foram observadas as médias aritméticas, os desvios-padrão e as medianas dos valores encontrados em cada semana, considerando-se a liberação da substância ao longo do tempo. Também foram calculados os intervalos de confiança para as médias amostrais em cada semana. O gráfico de linhas foi empregado para ilustrar o comportamento observado.

As pressões oculares aferidas antes da cirurgia e após 1, 4 e 8 semanas, foram avaliadas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Inicialmente, a análise estatística foi feita em cada um dos grupos e, então, os valores tonométricos dos animais do grupo I foram comparados àqueles verificados nos animais do grupo II (para essa última análise o teste é chamado de Wilcoxon).

Os resultados do ERG também foram analisados estatisticamente através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As amplitudes das ondas A e B foram estudadas, separadamente, comparando-se os valores obtidos antes e após oito semanas da colocação do implante.

RESULTADOS

4.1 DOSAGEM DE DEXAMETASONA

A tabela 2 apresenta os valores correspondentes às médias aritméticas, medianas, desvios-padrão e intervalos de confiança das concentrações intravítreas de dexametasona observadas após a dosagem, em cada uma das semanas de avaliação. A figura 12 mostra o perfil de liberação de dexametasona durante as oito semanas de avaliação. Pode-se observar o comportamento longitudinal dos dados na figura 13, que se confirma pela apresentação dos valores de média e de mediana. A figura 14 mostra o intervalo de confiança ($\alpha=5\%$), para as médias amostrais, revelando a variabilidade experimental.

Tabela 2 - Apresentação das concentrações intravítreas observadas, a cada semana, com as respectivas médias aritméticas, medianas, desvios-padrão e intervalos de confiança.

SEMANA	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO-PADRÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA ($\alpha=5\%$)	
				mínimo	máximo
1	613,6	611,4	69,7	545,3	681,9
2	308,6	306,3	53,5	256,2	361,0
3	326,5	324,5	58,0	269,7	383,3
4	856,1	856,1	124,2	734,4	977,8
5	2172,3	2171,7	148,4	2026,9	2317,7
6	2589,3	2586,8	124,1	2467,7	2710,9
7	2660,3	2660,7	169,0	2494,7	2825,9
8	2559,2	2559,4	122,0	2439,6	2678,8

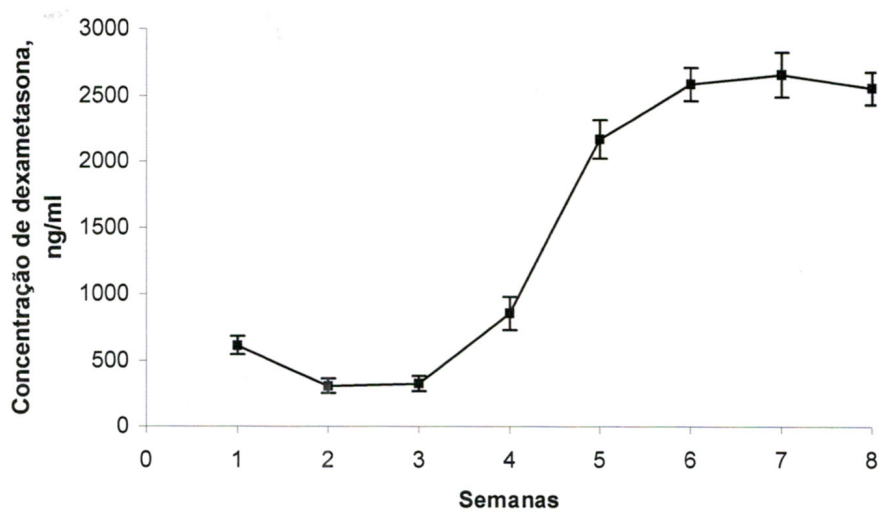


Figura 12 – Concentrações de dexametasona intravítreas ao longo das semanas do estudo.

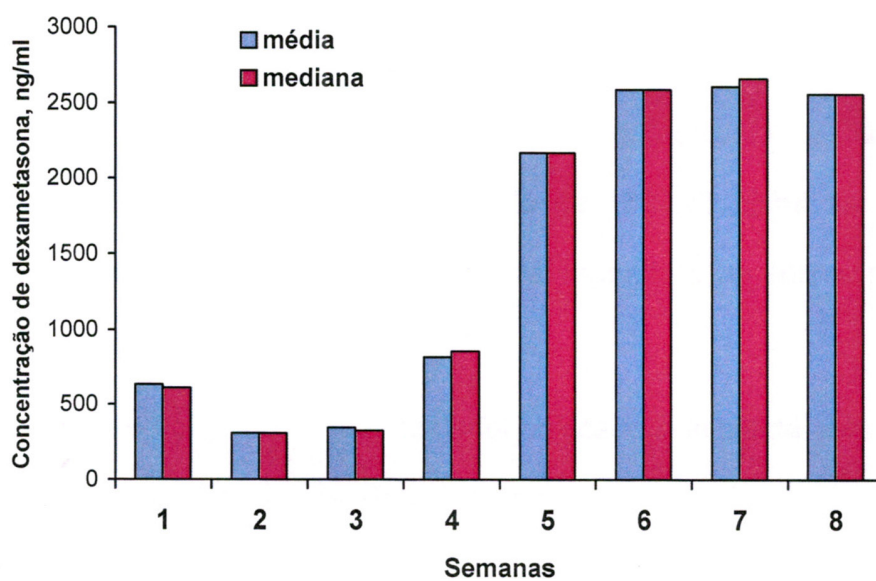


Figura 13 – Distribuição da média aritmética e da mediana das concentrações de dexametasona intravítrea, em cada semana de estudo.

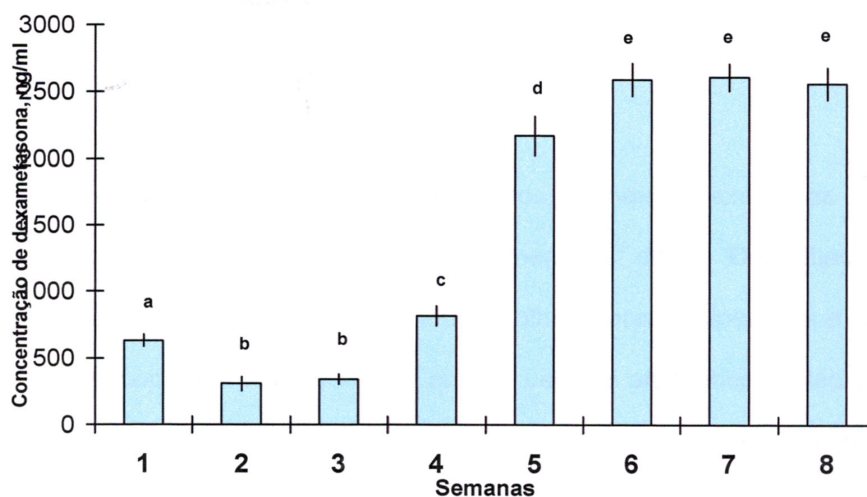


Figura 14 – Apresentação dos intervalos de confiança (95%) para as médias amostrais de dosagem de dexametasona intravítrea, ao longo das semanas do estudo. Letras iguais implicam em diferença estatística com 5% de significância.

Se todos os períodos forem analisados em conjunto, a média das concentrações intravítreas da droga terá sido de 1510,73 ng/ml até a oitava semana (variando de 308,6 a 2660,3 ng/ml, na segunda e na sétima semanas, respectivamente).

Nos animais do grupo II, nos quais foi colocado o implante sem a droga, não foi detectada a presença de dexametasona após a análise do vítreo pelo método ELISA.

4.2 OBSERVAÇÃO CLÍNICA

No acompanhamento pós-operatório dos animais, o exame de inspeção evidenciou alterações em um pequeno número de olhos. Dois dias após a cirurgia, um animal do grupo I apresentou, no olho operado, hiperemia e secreção conjuntival mucopurulenta, resolvidas com o uso de antibiótico tópico em uma semana. Complicação pós-cirúrgica grave ocorreu em outro coelho do grupo I, no qual foram observados hiperemia conjuntival intensa, opacificação dos meios oculares e hipópio no quarto dia, sugestivos de endoftalmite bacteriana. Este animal foi retirado da amostra do estudo e evoluiu com atrofia do bulbo ocular. Nos demais, a córnea permaneceu clara, sem edema ou congestão conjuntival, hipópio ou catarata.

Em relação aos achados oftalmoscópicos, dois animais, sendo um de cada grupo, apresentaram hemorragia vítrea discreta no exame da primeira semana. que não impediu o exame da retina e foi absorvida espontaneamente em três semanas, o que implicou na permanência desses animais na pesquisa. Outro animal do grupo I evoluiu com descolamento de retina, observado no exame da terceira semana, e também foi excluído do estudo. Nos demais o vítreo manteve-se claro, sem opacidades, e a retina, aplicada e com aspecto normal. O implante permaneceu junto à parede ocular, no local correspondente à esclerotomia, em todas as semanas do estudo (figura 15), mostrando sinais de desintegração evidentes a partir da quinta semana.

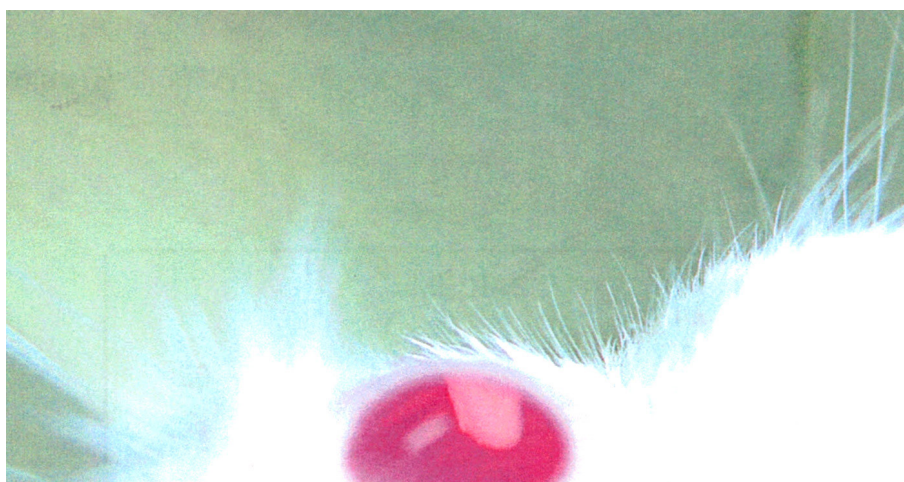


Figura 15 – Implante posicionado no sítio da esclerotomia ao final da primeira semana.

Quanto à tonometria, observou-se que um animal do grupo I apresentou PO média de 25,33 mmHg no olho que recebeu o implante, na última semana de avaliação, o que representou um aumento de 10 mmHg em relação ao seu valor médio pré-operatório. Nos demais, os valores tonométricos não mostraram tal elevação ao final do estudo, permanecendo abaixo de 20 mmHg. Na primeira semana foi observada hipotonia nos olhos operados dos animais de ambos os grupos. Porém, a análise estatística dos dados, realizada em cada um dos grupos separadamente, com o método não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os valores de PO do pré-operatório e da primeira, quarta e oitava semanas de avaliação, nos animais do grupo I ($P=0,0544$) e do grupo II ($P=0,2500$) (figura 16). A comparação da PO entre os grupos, antes da cirurgia e a cada semana, foi realizada com o teste não-paramétrico de Wilcoxon e não foram encontradas diferenças significativas no pré-operatório ($P=0,4705$) e após uma semana ($P=0,8852$), quatro ($P=0,3123$) e oito semanas ($P=0,5637$).

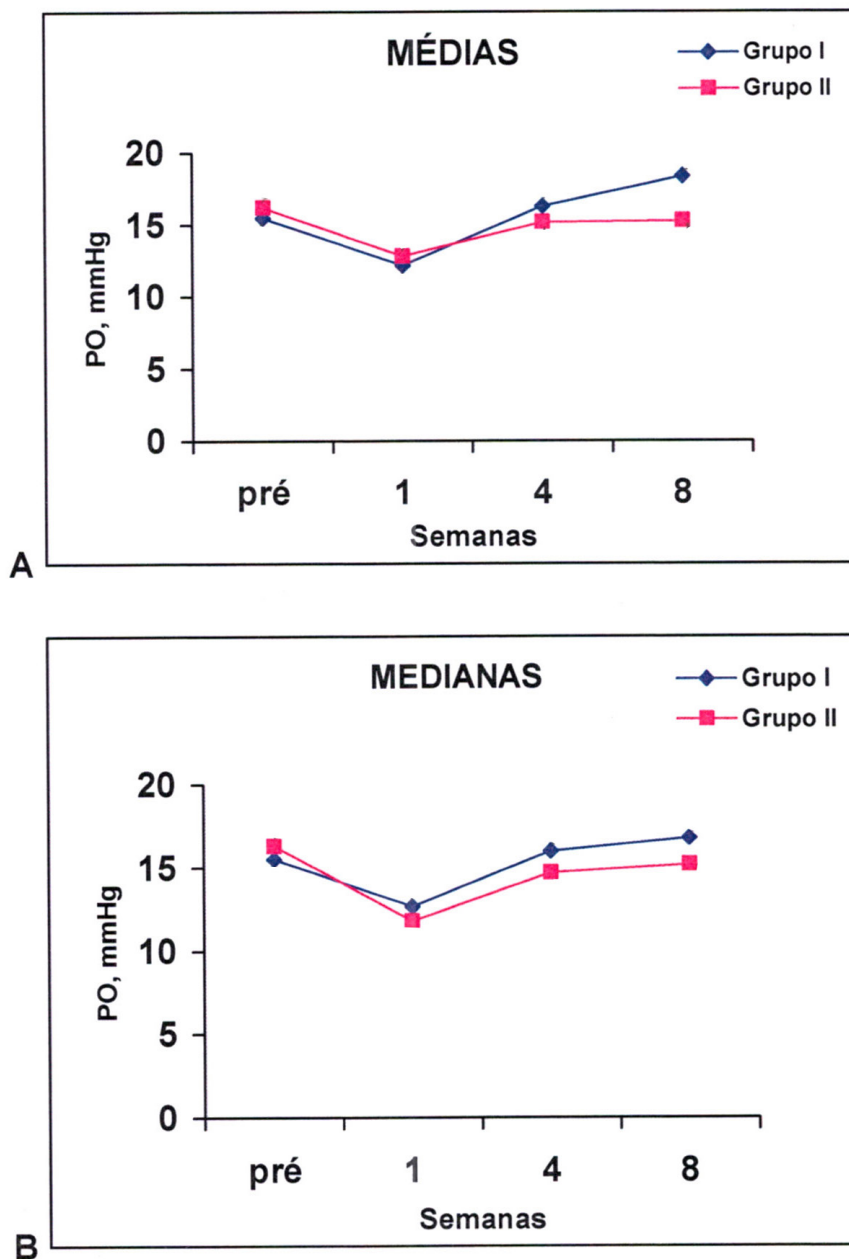


Figura 16 – Comportamento das médias (A) e medianas (B) dos valores de pressão ocular dos olhos experimentais, de ambos os grupos, ao longo do estudo (pré: pré-operatório).

4.3 ELETORRETINOGRRAFIA

O ERG não mostrou sinais de toxicidade retiniana causada pela dexametasona ou pela presença do polímero biodegradável na cavidade vítrea. As amplitudes das ondas A e B permaneceram normais após oito semanas de avaliação nos animais avaliados (figuras 17 e 18). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores pré-operatórios e os da oitava semana correspondentes às amplitudes das ondas A ($P=1,0000$) e B ($P=0,5637$).

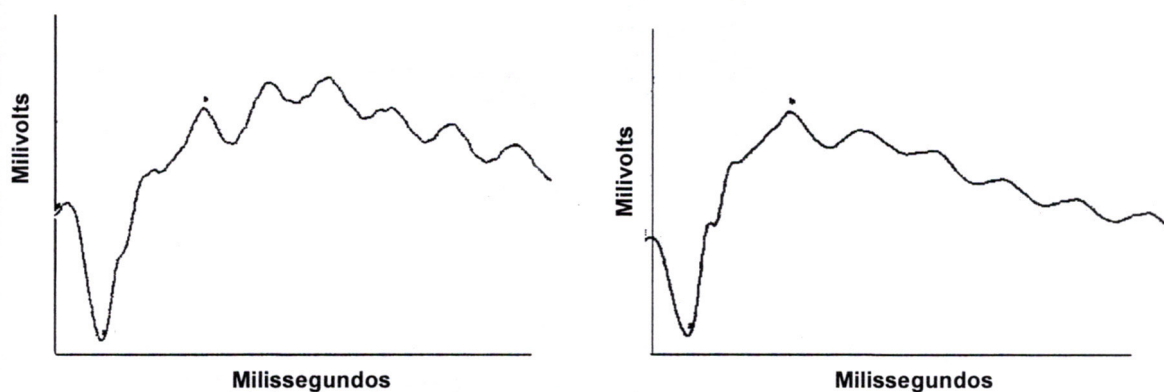


Figura 17 – Representação esquemática das curvas obtidas no estudo eletroretinográfico (resposta máxima combinada) de um olho experimental de um animal do grupo I antes da cirurgia para a colocação do implante (esquerda) e após 8 semanas (direita).

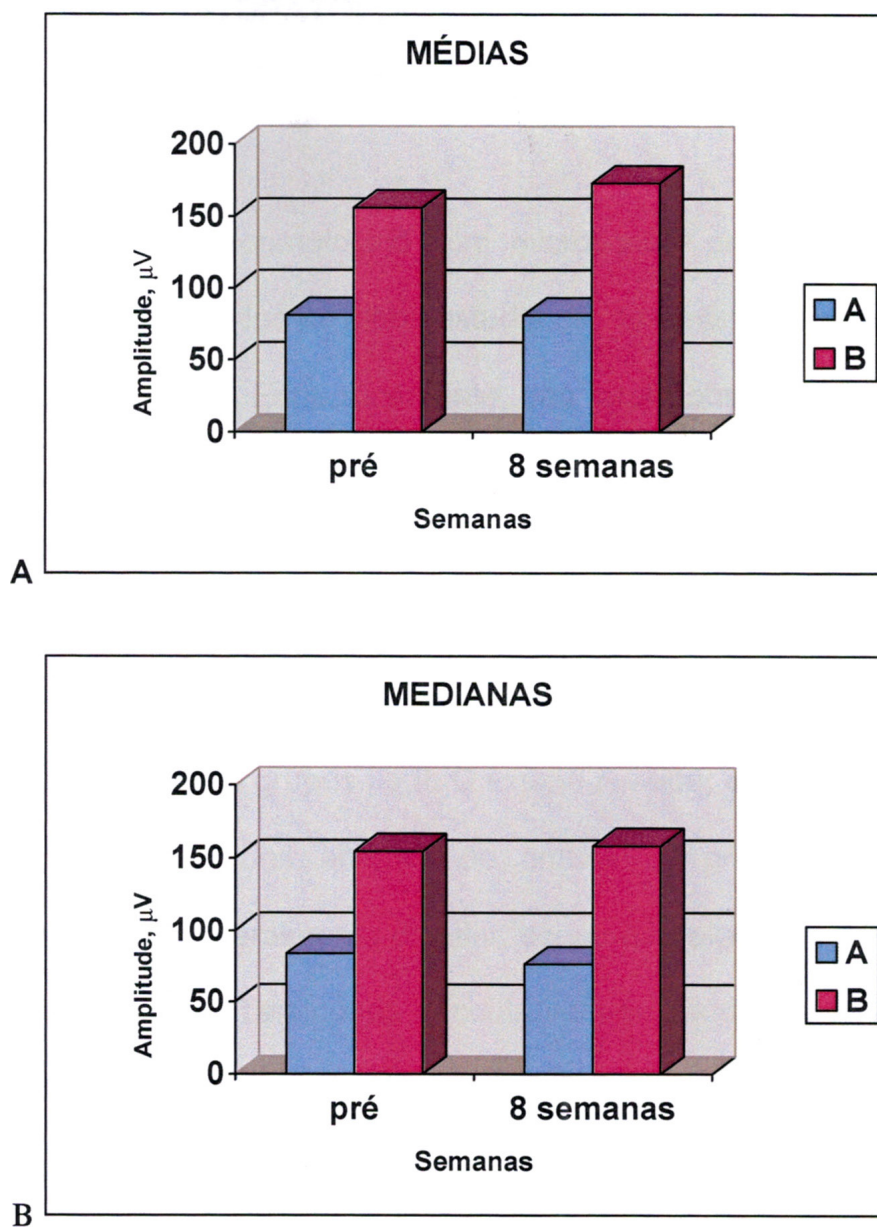


Figura 18 – Médias (A) e medianas (B) das amplitudes das ondas A e B, nos animais do grupo I, antes da cirurgia para a colocação do implante e após 8 semanas.

4.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

No exame histopatológico com microscopia de luz, a retina apresentou aspecto normal em todos os olhos estudados, de ambos os grupos, após a oitava semana de avaliação. Especificamente, não foram observados sinais de necrose retiniana, perda de fotorreceptores, degeneração cística, infiltrados inflamatórios ou hipocelularidade das camadas nucleares (figura 19). Na camada de células ganglionares observaram-se espaços entre as células de Müller, sem sinais de alteração anatômica ou toxicidade; tais espaços também foram encontrados na retina dos animais dos grupos I e II. O exame revelou, ainda, a presença de cones atípicos (nos olhos dos animais de ambos os grupos), representados por estruturas de forma geralmente circular, sendo que alguns apresentavam a forma fusiforme (figura 20). Tais cones encontravam-se distribuídos por todas as áreas da retina, isoladamente entre os bastonetes ou em grupos, com exceção da região de fibras mielinizadas, e eram mais abundantes na região posterior do olho (adjacente a essas fibras), onde sua concentração era de quatro a cinco cones por $100 \mu\text{m}^2$. Nos perfis de corte estudados, o diâmetro dos cones variou de 3 a $12 \mu\text{m}$ e foi maior naqueles fusiformes.

Na análise com microscopia eletrônica de transmissão, especial atenção foi direcionada para a possibilidade do achado de alterações descritas na literatura, conforme enfatizado na discussão, que pudessem caracterizar toxicidade retiniana. Assim, as células de Müller não apresentaram edema ou degeneração, ou impregnação marcante com os metais pesados (chumbo e urânio) utilizados para a obtenção de contraste, quando comparadas com outras células. Não se observou a presença de vacúolos entre as camadas plexiforme externa e nuclear

externa da retina ou de grânulos amorfos na superfície do EPR e na matriz dos fotorreceptores. Não ocorreram, ainda, desintegração e edema dos segmentos externos dos fotorreceptores (figura 21).

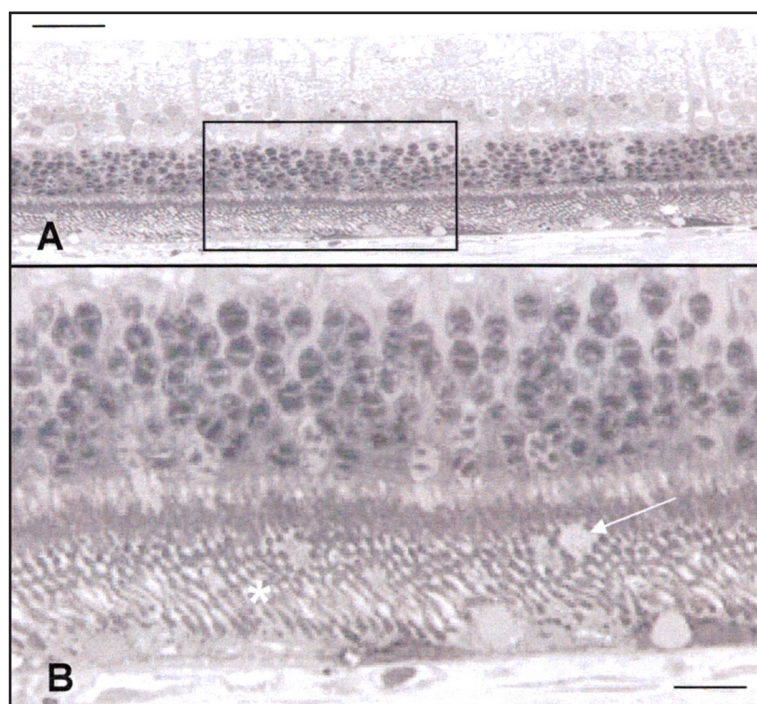


Figura 19 – (A) Corte semifino de retina de um animal do grupo I, corado com azul de toluidina. Aspecto morfológico normal preservado. Barra: 50 μ m. (B) Maior aumento do segmento destacado na foto superior. Barra: 10 μ m. Observar a camada de fotorreceptores com alguns cones atípicos (seta) e bastonetes (asterisco).

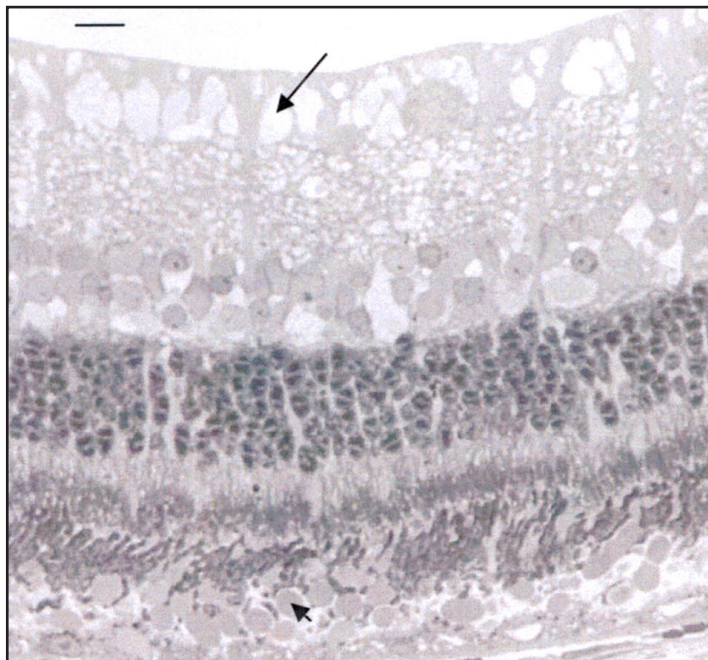


Figura 20 – Corte de retina de um animal do grupo II. A morfologia normal está preservada. Observar os espaços encontrados entre as células de Müller, na camada de células ganglionares (seta maior), e cones atípicos (seta menor). Corte semifino; corado com azul de toluidina. Barra: 20 μm .

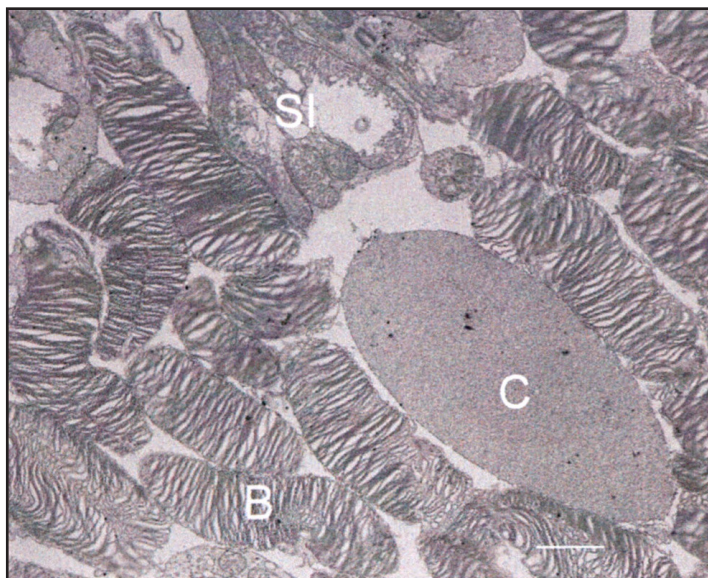


Figura 21 – Eletromicrografia da retina de um animal do grupo I. Região da camada de fotorreceptores, mostrando cone atípico (C) e vários bastonetes (B), sem alterações morfológicas. Observa-se o segmento interno de um cone (SI) com mitocôndria. Barra: 1 μm .

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou o perfil de liberação de dexametasona a partir de um implante biodegradável de PLGA, na cavidade vítrea de olhos de coelhos. Os níveis de droga apresentaram ligeira queda e estabilização nas semanas 2 e 3 quando comparados àqueles da primeira semana. Aumento importante da concentração foi observado após quatro semanas e o seu valor máximo foi obtido após a sétima semana, com sinais de declínio na oitava. Não se evidenciou toxicidade retiniana que pudesse ter sido provocada pela presença da droga ou do polímero.

Os implantes utilizados no estudo foram preparados pelo método de moldagem a quente, segundo a técnica descrita por Fialho e Silva-Cunha. Apresentavam-se como um sistema monolítico, no qual a droga se encontrava dispersa na matriz polimérica, e com pequena quantidade de poros na sua superfície, que se mostrava relativamente lisa (FIALHO; SILVA-CUNHA, 2005). A morfologia da superfície dos implantes tem um papel importante no seu processo de degradação e de liberação da droga, sendo que uma superfície mais lisa permite que a difusão da droga seja controlada principalmente pela velocidade de degradação do polímero (DASH; CUDWORTH, 1998).

O comportamento da curva de liberação de droga apresentou padrão trifásico, comumente observado quando se utilizam matrizes poliméricas biodegradáveis à base de polímeros derivados dos ácidos tático e glicólico (YASUKAWA et al., 2001). O primeiro estágio é caracterizado pelo *burst* inicial, causado pela rápida eliminação da droga depositada na superfície e nos canais aquosos da matriz, sendo, portanto, dependente da área total do implante e da quantidade de droga presente. No estudo, observou-se que a concentração de dexametasona ao final da primeira semana foi maior do que nas duas semanas

seguintes correspondendo a esse primeiro estágio. Teoricamente, esse *burst* inicial poderia causar efeitos oculares adversos em alguns casos, mas que não foram verificados em nosso estudo, haja vista a normalidade do ERG e da histologia de retina.

O segundo estágio é causado por uma liberação difusional e estável da droga, que ocorre antes do início da erosão da matriz polimérica. Nessa fase, a liberação é lenta e possivelmente controlada pela velocidade de degradação do polímero, área total da matriz e quantidade total da droga contida no implante. Em nosso estudo, níveis de dexametasona relativamente constantes ocorreram no período correspondente às semanas 2 e 3.

Na fase seguinte, há um *burst* súbito resultante da desintegração da matriz, percebido a partir da terceira semana até a sexta semana de avaliação, quando a concentração de droga intravítrea elevou-se de maneira importante. Foi observada relativa estabilização da concentração entre as semanas 6, 7 e 8, com sinais de declínio a partir da sétima semana de estudo.

As médias dos níveis intravítreos de dexametasona variaram de 308,6 ng/ml, na segunda semana, ao valor máximo de 2660,3 ng/ml na sétima semana após a cirurgia. Se se considerar todo o período do estudo, a média obtida terá sido de $1510,7 \pm 1075,8$ ng/ml, tendo permanecido acima de 2000 ng/ml a partir da quarta semana. Os resultados deste trabalho, obtidos com um implante contendo 1,0 mg de dexametasona, revelam concentrações de droga mais baixas nas primeiras semanas em relação àquelas observadas por Hainsworth e cols. ao analisarem a farmacocinética de um implante intravítreo não-biodegradável de PVA e EVA, contendo 5,0 mg de dexametasona em olhos de coelhos. A concentração média observada foi de 2500 ± 1200 ng/

ml no interior do vítreo durante aproximadamente três meses e a cinética de liberação das drogas ocorreu de modo linear (HAINSWORTH et al., 1996). Aspectos relacionados às características do implante e à maior quantidade de dexametasona contida nele podem explicar os valores pouco superiores àqueles observados na fase inicial deste estudo e as diferenças no perfil de liberação. A menor duração desta pesquisa não permite também a comparação dos resultados após o segundo mês.

Jaffe e cols. avaliaram a liberação de fluocinolona a partir de um implante não-biodegradável também constituído de PVA e EVA, contendo 2,0 mg da droga na cavidade vítrea de olhos de coelhos. Os níveis intravítreos encontrados permaneceram entre 100 e 210 ng/ml durante o período estudado (um ano). Os autores predisseram que o implante poderia liberar a droga por aproximadamente três anos, o que favoreceria o seu uso no tratamento de uveítes, as quais geralmente persistem por longos períodos (JAFFE et al., 2000a). Assim como foi observado no trabalho de Hainsworth e cols. a cinética de liberação das drogas ocorreu de modo linear. A obtenção desse perfil ideal de liberação, com níveis intravítreos constantes, é comumente observada com esses polímeros não-biodegradáveis e estimula continuamente o surgimento de novas pesquisas com polímeros biodegradáveis (YASUKAWA et al., 2001).

Em relação ao implante Posurdex[®], de PLGA, sua duração foi de aproximadamente 6 a 8 semanas, mas a melhora da AV proporcionada pela liberação da droga persistiu por até 180 dias, havendo ainda melhora dos sinais de edema retiniano ao OCT e à AF. Os níveis intravítreos de dexametasona proporcionados por esse implante em olhos de coelhos são descritos com a dose de 700 µg de droga: aproximadamente 10.000 ng/ml por 35 dias,

permanecendo acima de 1000 ng/ml por mais uma semana (DE CARVALHO, 2002). A combinação da droga com o polímero pode, entretanto, ser alterada e permitir a liberação de dexametasona por até um ano (BUDDI; ELIOTT, 2004), o que também pode ser feito na composição do implante utilizado neste estudo.

O padrão trifásico observado corresponde àquele descrito por Kunou e cols. ao analisarem a liberação in vivo de ganciclovir a partir de implantes de PLGA 75:25. Os autores relatam a ocorrência do aumento súbito da concentração intravítrea (terceira fase) na oitava semana e o fato de uma maior quantidade de droga adicionada aos implantes (até 40% da sua composição) resultar em um *burst* inicial mais evidente (KUNOU et al., 1995). É provável que esse fato seja devido aos numerosos canais aquosos formados na matriz polimérica por efeito osmótico (COLO, 1992). Em outro trabalho os níveis intravítreos de betametasona foram analisados após a colocação de implantes de PLGA 85:15 em olhos de coelhos; o padrão observado foi bifásico, composto por um *burst* inicial e um segundo estágio secundário à liberação difusional da droga (KUNOU et al., 2000). A maior quantidade proporcional de PLA faz com que o co-polímero utilizado na composição desse implante seja mais hidrofóbico quando comparado ao do nosso estudo e a matriz polimérica, menos sensível à desintegração. Como resultado, a liberação da droga é mais lenta e a sua concentração não se eleva subitamente, o que caracterizaria uma terceira fase.

O perfil de liberação de dexametasona observado neste primeiro estudo in vivo com o implante permite supor que sua aplicação clínica seja direcionada para casos de edema macular secundário a retinopatia diabética, oclusão venosa da retina e cirurgia ocular que atualmente podem ser tratados com injeções de triancinolona, ou na prevenção de PVR após cirurgia de vitrectomia para casos

de descolamento de retina. Essas doenças apresentam maior possibilidade de responder a um tratamento corticoterápico com duração de 3 meses (LIANG et al., 1994; MARTIDIS et al., 2002; KARACORLU et al., 2003; KREPLER et al., 2005;). Doenças com curso mais crônico, como as uveítes, necessitariam de mudanças na composição do implante para que a liberação ocorra por meses ou anos, como é o caso do Retisert” (JAFFE et al., 2000a).

Alguns autores relataram o sucesso do tratamento de edema macular com injeção subtenoniana de triancinolona. (YOSHIKAWA et al., 1995). A dose utilizada é, geralmente, de 40 mg, que corresponde à apresentação comercial do fármaco. Entretanto, não foram realizados estudos que pudessem determinar os níveis intravítreos obtidos com essa quantidade da droga em indivíduos que possuem escleras com características sabidamente diferentes, como míopes e hipermetropes, para que essa posologia fosse recomendada. Conseqüentemente, as concentrações de droga no vítreo, retina e coróide podem, em teoria, ser diferentes em cada caso. Outros fatores que apresentam variações individuais, como a pressão intraocular, o fluxo uveoescleral, o fluxo sanguíneo da coróide e as barreiras hemato-retiniana interna e externa, também podem interferir na penetração das drogas para o segmento posterior (AMBATI et al., 2000). Desse modo, a injeção pode resultar em toxicidade intraocular em olhos susceptíveis ou em níveis subterapêuticos. A resposta terapêutica nos casos de edema macular parece estar relacionada à proximidade do corticosteróide com essa região e o insucesso do tratamento pode ser conseqüente à sua presença em um local relativamente distante da mácula. A colocação precisa da droga sobre a área desejada enfrenta dificuldades técnicas e pode ser assegurada apenas com exames oftalmológicos complementares, como a ultrassonografia (FREEMAN

et al., 1987). Outra dificuldade rotineiramente encontrada e que reduz a dose da droga a ser administrada é o refluxo durante a injeção. Apesar desses fatores, a via subtenoniana é menos invasiva e apresenta menores riscos do que a cirurgia necessária para a colocação do implante. As vantagens representadas pelo implante são a maior previsibilidade e a obtenção de níveis controlados de droga na cavidade vítrea, o que garante maior segurança na sua administração, e melhor controle para a obtenção do seu nível terapêutico.

A injeção intravítrea de corticosteróides, por sua vez, tem-se mostrado um método relativamente seguro e eficaz na supressão de inflamação intraocular em inúmeras condições infecciosas (GRAHAN; PEYMAN, 1974) e não-infecciosas (JENNINGS et al., 1988). O uso da triancinolona expandiu-se na atualidade e vem sendo adotada, preferencialmente, essa via de administração. Após a injeção, a droga tende a se condensar inferiormente devido à gravidade e à rápida difusão do veículo salino da suspensão do corticosteróide. A pequena circulação de fluidos no interior do olho, que é mais evidente em um olho não-vitrectomizado (SCHINDLER et al., 1982), bem como a formulação da droga na forma de suspensão, contribuem para que a dissolução da triancinolona seja lenta, podendo ser detectada no vítreo por um período de 21 a 41 dias e com meia-vida de 1,6 dia (SCHINDLER et al., 1982; SCHOLEES et al., 1985).

A dexametasona é um glicocorticóide de ação prolongada e sua potência relativa é quase cinco vezes maior do que a da triancinolona: a dose de 0,75 mg equivale a aproximadamente 4 mg de triancinolona (HAYNES; MURAD, 1990). Quando injetada no segmento posterior, mantém-se por 7 a 14 dias no vítreo, com uma meia-vida de menos de quatro horas (GRAHAN et al., 1974; KWAK et al., 1992). O desenvolvimento de um sistema para a liberação lenta e programada

de dexametasona intravítrea permitirá que a maior atividade antiinflamatória da droga seja associada a um efeito terapêutico mais prolongado, com maior tempo de permanência no interior do olho, ampliando suas indicações no tratamento de diversas doenças inflamatórias que acometem a retina e o vítreo. Além disso, pode proporcionar grande vantagem para olhos submetidos à vitrectomia, que requerem uma frequência ainda maior de novas injeções nos casos de tratamento antiinflamatório intravítreo. Embora não seja possível comparar diretamente esses dois métodos de administração de droga para a cavidade vítrea, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o implante biodegradável contendo dexametasona seja um método seguro para a liberação prolongada de corticosteróide no segmento posterior do olho.

O estudo aqui apresentado não testou, especificamente, a eficácia do implante, mas, baseando-se na potência antiinflamatória da dexametasona e em evidências preliminares de que os implantes com essa droga são efetivos (HAINSWORTH et al., 1996; CHENG et al., 1995; JAFFE et al., 2000b), supôs que a droga liberada pelos implantes exerceria efeito terapêutico em olhos com processos inflamatórios. Ficou demonstrado que a concentração efetiva de dexametasona para suprimir vários processos inflamatórios, incluindo-se a produção de citocinas, a síntese de prostaglandinas e a migração e função dos leucócitos, é de 0,15 a 4,00 µg/ml (150 a 4000 ng/ml) (CULPEPPER; LEE, 1985; LEWIS et al., 1986; GRABSTEIN et al., 1986; KNUDSEN et al., 1987; LEE et al., 1988). Tais níveis foram obtidos neste experimento, no qual o menor nível de droga intravítrea detectado foi de 245,6 ng/ml em um animal, na segunda semana após a cirurgia.

A dosagem da dexametasona foi realizada somente até a oitava semana de observação, cuidando-se para que o número de animais disponíveis para análise a cada semana fosse maximizado, atingindo o número mínimo de quatro no grupo I e de dois no grupo II. Outros estudos que avaliaram a concentração intravítrea de droga a partir de sistemas de liberação lenta em olhos normais divulgaram seus resultados após um tempo menor do que o do presente estudo, sendo em alguns casos de apenas quatro semanas (MORITA et al., 1998; KUNOU et al., 2000), quando os níveis ainda não haviam decrescido de forma significativa. Não é possível, portanto, afirmar que os níveis intraviteos da droga apresentaram, a partir de então, valores uniformemente decrescentes com o tempo (o que é sugerido pela figura 12). Acredita-se, porém, que os níveis terapêuticos mantêm-se por um período total de três meses após a colocação do implante, baseando-se no perfil de liberação observado.

Os resultados mostram a semelhança entre os valores das médias aritméticas e das medianas das concentrações intravítreas de dexametasona, sugerindo simetria nas distribuições probabilísticas envolvidas no evento estudado. Atente-se para o pequeno desvio do intervalo de confiança, revelando que houve boa padronização dos procedimentos laboratoriais e um controle efetivo das condições do acaso no ambiente experimental. Assim, pode-se dizer, de maneira descritiva, que as medidas na segunda e na terceira semanas apresentaram queda estatisticamente significativa dos níveis de droga em relação à primeira, porém, com semelhança entre si. A partir da quarta semana, até a sexta, houve aumento das concentrações e o teste estatístico evidenciou diferença significativa na comparação entre essas três semanas, que também foi observada quando os valores da quarta semana foram comparados aos iniciais. Entre as semanas 6, 7

e 8 os níveis de liberação da droga foram maiores do que nas medidas anteriores, mas sem diferença estatística.

As medidas tonométricas, realizadas uma semana após a cirurgia mostraram queda desses valores em certo número de olhos operados de ambos os grupos, o que afasta a influência da droga nesse comportamento. Isso pode ser atribuído à discreta perda vítrea que ocorreu em alguns olhos no momento da esclerotomia para a colocação dos implantes, causando certo grau de hipotonia ainda no per-operatório. Optou-se por não realizar a injeção de solução salina balanceada na cavidade vítrea, para o aumento da pressão ocular, pois sua presença poderia interferir na liberação da droga a partir dos implantes e nas características naturais do vítreo. Além disso, a hipotonia observada foi considerada leve em todos os olhos ao final da cirurgia. O aumento da pressão ocular observado no olho experimental de um animal do grupo I sugere que tal fato possa ter sido provocado pela presença da dexametasona. Acredita-se que a hipertensão ocular induzida por corticosteróides seja dependente da dose e da duração do tratamento e, presumivelmente, reflexo da quantidade de droga que atinge a câmara anterior e a malha trabecular (BECKER, 1965; ARMALY, 1967). A presença da droga nessa região do olho não foi avaliada neste estudo e, apesar de isto ser esperado, não se pode assegurar que tenha atingido níveis terapêuticos. Novas pesquisas poderão trazer dados clínicos relevantes sobre o tema.

Todavia, alguns fatores devem ser considerados na interpretação dos resultados tonométricos. O efeito hipertensivo ocular da droga pode ter sido equilibrado pela discreta hipotensão observada na primeira semana em alguns animais. Além disso, ficou demonstrado, em estudo anterior, que os coelhos apresentam menor susceptibilidade para o aumento da pressão ocular induzida

por uso de corticosteróide do que o homem (KNEPPER et al., 1978). Um período de seguimento superior a oito semanas e com uma amostra maior talvez pudesse ter evidenciado maior número de olhos com hipertensão ocular. Finalmente, esse comportamento pode mostrar-se diferente em olhos com inflamação ou qualquer doença ocular após a colocação do implante contendo dexametasona. Futuros testes clínicos deverão excluir, obviamente, pacientes com história de glaucoma ou de aumento da pressão ocular após uso de corticosteróides.

O uso de ketamina intramuscular para a anestesia dos animais durante os procedimentos cirúrgicos é capaz de provocar o aumento da pressão ocular em olhos de coelhos. Sabe-se, porém, que o efeito hipertensivo da droga é, em média, de apenas 7% (ANTAL et al, 1978); as variações observadas na tonometria da maioria dos animais não atingiram valores que pudessem caracterizar hipertensão ocular, com exceção do animal do grupo I. Quanto ao ERG, não é relatada influência da ketamina no resultado do exame (SASOVETZ, 1978).

Com exceção das ocorrências de descolamento de retina em um olho experimental e de endoftalmite em outro, causadas, possivelmente, por rasgo retiniano na região da esclerotomia e contaminação a partir da superfície ocular, respectivamente, os exames de inspeção e oftalmoscopia binocular indireta não evidenciaram sinais de toxicidade que pudessem ser atribuídas ao implante biodegradável ou à dexametasona, incluindo a formação de catarata. Porém, o tempo de seguimento pode não ter sido suficientemente longo para possibilitar sua ocorrência, pois é sabido que a catarata é uma consequência adversa do uso prolongado de corticosteróides (URBAN; COTLIER, 1986). Não houve, portanto, trauma ou toque na cápsula posterior do cristalino no momento da esclerotomia para a colocação do implante que pudessem provocar a sua opacificação. Não

ocorreu, ainda, a migração implante do local de sua inserção, o que impede o surgimento de miiodopsia devido à sua presença no campo visual.

A ausência de sinais de toxicidade intraocular foi confirmada nos estudos com ERG e histopatologia, sendo que outros autores também relataram a biocompatibilidade do PLGA (KIMURA et al., 1994; HASHIZOE et al., 1994). Os cortes incluídos em parafina foram examinados e a avaliação detalhada foi feita nos cortes semifinos, incluídos em resina, que apresentam melhor qualidade de preservação e melhor definição de imagem em face da sua reduzida espessura. O exame realizado com microscópio de luz evidenciou a presença de cones atípicos distribuídos por todas as áreas da retina, com exceção da região de fibras mielinizadas, e mais abundantes na região posterior do olho (adjacente a essas fibras). Sua presença, entretanto, é descrita na literatura como uma característica natural da espécie animal utilizada no estudo (PEIFFER et al., 1994). Os espaços encontrados entre as células de Müller na camada de células ganglionares em ambos os grupos não caracterizaram toxicidade e o seu aparecimento pode ter sido causado pela técnica histológica.

A concentração máxima de dexametasona intravítrea obtida neste estudo (2.866,9 ng/ml) permaneceu abaixo daquela considerada capaz de apresentar efeitos tóxicos para a retina durante todo o período avaliado. Nenhuma anormalidade foi detectada por Grahan e Peyman após dois meses da injeção intravítrea de 400 µg (40.000 ng) de dexametasona em coelhos, nos exames de oftalmoscopia indireta, ERG e microscopia de luz da retina (GRAHAN; PEYMAN, 1974). A toxicidade retiniana da dexametasona foi estudada também após a injeção de 440 µg a 4000 µg da droga diretamente na cavidade vítrea de olhos de coelhos, por um período de três meses. Esse estudo mostrou que a injeção de 440

μg (dose total intravítrea) provoca a impregnação marcante das células de Müller pelo corante utilizado para a obtenção do contraste, mais evidente após seis horas da injeção e com normalização após dois dias. Essa impregnação foi considerada reacional, e não degenerativa, não tendo sido observadas alterações estruturais com essa dosagem com microscopia de luz e microscopia eletrônica. Porém, após a injeção da droga em doses iguais a ou maiores que 800 μg , as células de Müller apresentaram edema e degeneração; surgiram, ainda, pequenos vacúolos entre as camadas plexiforme externa e nuclear externa e cuja quantidade era dose-dependente. Doses maiores que 1200 μg de dexametasona resultaram no acúmulo de grânulos amorfos na superfície do EPR e na matriz dos fotorreceptores, além de desintegração e edema dos segmentos externos dos fotorreceptores. Os autores concluíram que o sítio primário de reação tóxica à dexametasona intravítrea é a célula de Müller, provavelmente devido à sua influência no aumento dos níveis de glutamina sintetase e, conseqüentemente, de glutamato neuronal (produzindo disfunção celular e reação tóxica), e no comprometimento do metabolismo e transporte da glicose nessa célula, que possui alto conteúdo de glicogênio (KWAK; D'AMICO, 1992). A dose da droga comumente utilizada em injeções intravítreas é de 0,4 mg/0,1 ml (400 μg), e também não foi relatada toxicidade da droga através dos exames biomicroscópico, oftalmoscópico, eletrorretinográfico e histopatológico após três injeções consecutivas dessa dosagem em olhos de coelhos, em intervalos de 48 horas (YOSHIZUMI et al., 1999).

O presente estudo utilizou-se apenas de animais sadios, com olhos normais, para que qualquer efeito adverso atribuído à droga ou ao polímero pudesse ser correlacionado com os níveis intravítreos de dexametasona liberada, não sendo confundido com inflamação intraocular. É possível que a farmacocinética

do implante seja diferente em olhos inflamados, o que não foi objetivo desta pesquisa. Os resultados de alguns estudos reforçam a idéia de que durante o episódio de inflamação aguda, quando há a quebra da barreira hemato-retiniana e passagem de alguns componentes do sangue para o olho, o implante pode apresentar uma taxa de liberação maior; assim que o processo é controlado, com restauração da barreira, essa taxa diminui (GUO et al., 1994; CHENG et al., 1995). Se isto for confirmado, essa cinética de liberação seria uma vantagem adicional do sistema de liberação prolongada, já que a droga é entregue de acordo com a gravidade da doença. Para comprovar in vivo a eficácia terapêutica do implante, novas pesquisas devem ser realizadas empregando-se modelos experimentais de inflamação ocular e PVR.

As doenças do segmento posterior do olho que exigem a manutenção de níveis terapêuticos de drogas por períodos prolongados, convivem, cada vez mais, com uma nova e promissora opção para se obter resultados satisfatórios no seu tratamento. A alteração de algumas variáveis da composição do implante pode ser feita de acordo com as particularidades de cada caso, otimizando o perfil de liberação de dexametasona. A eficácia e a aplicabilidade clínica do implante devem ser complementadas com novas investigações que poderão apoiar-se nos dados apresentados.

CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que o implante biodegradável de PLGA contendo dexametasona é capaz de promover a liberação da droga para o interior do vítreo de olhos de coelhos através de um padrão de liberação trifásico. O perfil observado mostrou níveis de droga ligeiramente menores na segunda fase da liberação (que corresponde à segunda e terceira semanas) quando comparados aos valores da primeira semana, seguido de um aumento da concentração a partir da terceira semana, o que caracterizou a terceira fase. Durante todo o período avaliado, níveis terapêuticos de dexametasona intravítrea foram detectados após a análise das amostras com o método ELISA.

O implante utilizado nesta pesquisa mostrou-se um método seguro de liberação prolongada de dexametasona no segmento posterior do olho. Não foram evidenciados sinais de toxicidade retiniana, que pudessem ter sido causados pela presença da dexametasona ou do PLGA na cavidade vítrea, após a realização de ERG e histopatologia (com microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão). A função da retina e seu aspecto anatômico mantiveram-se preservados ao final da oitava semana de avaliação.

REFERÊNCIAS

Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 2004;100: 528

Ahmed I, Gokhale RD, Shah MV, Patton TF. Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera and cornea. *J Pharm Sci*. 1987;76:583-6.

Ambati J, Canakis CS, Miller JW, Gragoudas ES, Edwards A, Weissgold DJ, Kim I, Delori FC, Adamis AP. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1181-5.

Antal M, Mucsi G, Faludi A. Ketamine anesthesia and intraocular pressure. *Ann Ophthalmol*. 1978;10:1281-4, 1289.

Armaly MF. Effect of corticosteroids on intraocular pressure and fluid dynamics. I. The effect of dexamethasone in the normal eye. *Arch Ophthalmol*. 1967;77:234-7.

Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. 1996;17:93-102.

Baker CW, Hainsworth DP, Conklin JD, Ashton P. In vitro and in vivo evaluation of sustained-release intravitreal dexamethasone devices. *ARVO Abstracts*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:1492.

Barza M, Baum J, Szoka F Jr. Pharmacokinetics of subconjunctival liposome-encapsulated gentamicin in normal rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25:486-90.

Barza M, Kane A, Baum JL. Intraocular penetration of gentamicin after subconjunctival and retrobulbar injection. *Am J Ophthalmol*. 1978a;85:541-7.

Barza M, Kane A, Baum JL. Regional differences in ocular concentration of gentamicin after subconjunctival and retrobulbar injection in rabbit. *Am J Ophthalmol*. 1977;83:407-13.

Barza M, Stuart M, Szoka F Jr. Effect of size and lipid composition on the pharmacokinetics of intravitreal liposomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28:893-900.

Barza M. Factors affecting the intraocular penetration of antibiotics. The influence of route, inflammation, animal species and tissue pigmentation. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1978b;14:151-9.

Bausch & Lomb News. FDA accepts for review Bausch & Lomb's new drug application for Retisert™ implant for non infectious posterior uveitis. 2004 Dec [citado 2005 Jan 09]; [cerca de 2p.]. Disponível em: <http://www.bausch.com/us/vision/about/news/pressrelease.jsp?pressRelease=20041214retisert.html>.

Becker B. Intraocular pressure response to topical corticosteroids. *Invest Ophthalmol.* 1965;4:198-205.

Ben-Nun J, Cooper RL, Cringle SJ, Constable IJ. Ocular dialysis. A new technique for in vivo pharmacokinetic measurements. *Arch Ophthalmol.* 1988;106:254-9.

Berger AS, Cheng CK, Pearson PA, Ashton P, Crooks PA, Cynkowski T, Cynkowska G, Jaffe GJ. Intravitreal sustained release corticosteroid-5-fluorouracil conjugate in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2318-25.

Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retina) pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol.* 1999;155: 421-8.

Blair MJ, Gionfriddo JR, Polazzi LM, Sojka JE, Pfaff AM, Bingaman DP. Subconjunctivally implanted micro-osmotic pumps for continuous ocular treatment in horses. *Am J Vet Res.* 1999;60:1102-5.

Buddi R, Elliott D. Emerging Treatments for Diabetic Eye Disease: Update on Clinical Trials. *Retinal Physician* [periódico na Internet]. 2004 Oct [citado 2005 Jan 06]; [cerca de 10 p.]. Disponível em: <http://www.retinalphysician.com/article.aspx?article=100022>.

Butler JM, Guthrie SM, Koc M, Afzal A, Caballero S, Brooks HL, Mames RN, Segal MS, Grant MB, Scott EW. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *J Clin Invest.* 2005;115:86-93.

Challa JK, Gillies MC, Penfold PL, Gyory JF, Hunyor AB, Billson FA. Exudative macular degeneration and intravitreal triamcinolone: 18 month follow up. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1998; 26: 277-81.

Chang DF, Garcia 1H, Hunkeler JD, Minas T. Phase II results of an intraocular steroid delivery system for cataract surgery. *Ophthalmology.* 1999;106:1172-7.

Charap AD. Corticosteroids. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. *Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology.* Philadelphia: JB Lippincott; 1992.

Cheng CK, Berger AS, Pearson PA, Ashton P, Jaffe GJ. Intravitreal sustained-release dexamethasone device in the treatment of experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:442-53.

Ciulla TA, Walker JD, Fong DS, Criswell MH. Corticosteroids in posterior segment disease: an update on new delivery systems and new indications. *Curr Opin Ophthalmol.* 2004;15:211-20.

Colo GD. Controlled drug release from implantable matrices based on hydrophobic polymers. *Biomaterials.* 1992;13:850-56.

Culpepper JA, Lee F. Regulation of IL 3 expression by glucocorticoids in cloned murine T lymphocytes. *J Immunol.* 1985;135:3191-7.

Cunha-Vaz JG. The blood-ocular barriers: past, present, and future. *Doc Ophthalmol.* 1997;93:149-57.

Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res.* 2004;78:715-21.

Danis RP, Ciulla TA, Pratt LM, Anliker W. Intravitreal triamcinolone acetonide in exudative age-related macular degeneration. *Retina.* 2000; 20:244-50.

Dash AK, Cudworth II GC. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Tox Meth.* 1998;40:1-12.

De Carvalho RA. Pharmacokinetics of a novel intravitreal dexamethasone biodegradable drug delivery system (DEX-BDD). *ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3874.

Dohlman CH, Pavan-Langston D, Rose J. A new ocular insert device for continuous constant-rate delivery of medication to the eye. *Ann Ophthalmol.* 1972;4:823-32.

Duke-Elder S, Ashton N. Action of cortisone on tissue reactions in inflammation and repair with special reference to the eye. *Br J Ophthalmol* 1951;35:695-707.

Edwards A, Prausnitz MR. Fiber matrix model of sclera and corneal stroma for drug delivery to the eye. *Am Inst Chem Eng J.* 1998;44:214-25.

Einmahl S, Zignani M, Varesio E, Heller J, Veuthey JL, Tabatabay C, Gurny R. Concomitant and controlled release of dexamethasone and 5-fluorouracil from poly(ortho ester). *Int J Pharm.* 1999;185:189-98.

Fialho SL, Rêgo MB, Cardillo JA, Siqueira RC, Jorge R, Silva-Cunha A. Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular. *Arq Bras Oftalmol.* 2003;66:891-6.

Fialho SL, Silva-Cunha A. Iontoforese no transporte ocular de drogas. *Arq Bras Oftalmol.* 2004;67:839-45.

Fialho SL; Silva-Cunha A. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended to intraocular application. *Drug Delivery.* 2005;12:1-8.

Floman N, Zor U. Mechanism of steroid action in ocular inflammation: Inhibition of prostaglandin production. *Invest Ophthalmol.* 1977;16:69-73.

Forster S, Mead A, Sears M. An interophthalmic artery as explanation for the consensual irritative response of the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979;18:161-5.

Foster CS, Sains de la Maza M. *The Sciera*. New York: Springer-Verlag;1994.

Foulds WS, Moseley H, Eadie A, McNaught E. Vitreal, retinal, and pigment epithelial contribution to the posterior blood-ocular barrier. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1980;100:341-2.

Frangie JP, Leibowitz HM. Steroids. *Int Ophthalmol Clin*. 1993;33:9-29.

Freeman WR, Green RL, Smith RE. Echographic localization of corticosteroids after periocular injection. *Am J Ophthalmol*. 1987;103:281-8.

Friedberg ML, Pleyer U, Mondino BJ. Device drug delivery to the eye. Collagen shields, iontophoresis, and pumps. *Ophthalmology*. 1991;98:725-32.

Geroski DH, Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:961-4.

Gordon DM, McLean JM. Effects of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) therapy in ophthalmologic conditions. *JAMA* 1950;142:1271-6.

Grabstein K, Dower S, Gills S, Urdal D, Larsen A. Expression of interleukin 2, interferon- γ , and the IL 2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4503-08.

Grahan RO, Peyman GA. Intravitreal injection of dexamethasone: Treatment of experimentally induced endophthalmitis. *Arch Ophthalmol*. 1974;92:149-54.

Grossman R, Lee DA. Transscleral and transcorneal iontophoresis of ketoconazole in the rabbit eye. *Ophthalmology*. 1989;96:724-9.

Guo H, Cynkowski T, Cynkowski G, Riggs R, Crooks PA, Ashton P. Disease enhanced co-delivery of acyclovir and flurbiprofen from a bioerodible sustained-release device. *ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:1907.

Gupta OP, Boynton JR, Sabini P, Markowitch W Jr, Quatela VC. Proptosis after retrobulbar corticosteroid injections. *Ophthalmology*. 2003;110:443-7.

Hainsworth DP, Pearson PA, Conklin JD, Ashton P. Sustained release intravitreal dexamethasone. *J Ocul Pharmacol Ther*. 1996;12:57-63.

Hashizoe M, Ogura Y, Kimura H, Moritera T, Honda Y, Kyo M, Hyon SH, Ikada Y. Scierai plug for biodegradable polymers for controlled drug release in the vitreous. *Arch Ophthalmol*. 1994;112:1380-4.

Hattori K, Heissig B, Rafii S. The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:575-82.

Haynes-Jr RC, Murad F. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of adrenocortical steroid biosynthesis. In: Gilman AG, Tall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Pergamon Press; 1990. p.1431-62.

Hida T, Chandler D, Arena JE, Macheimer R. Experimental and clinical observations of the intraocular toxicity of commercial corticosteroid preparations. *Am J Ophthalmol*. 1986;101:190-5.

Hwang DG, Stern WH, Hwang PH, McGowan-Smith LA. Collagen shield enhancement of topical dexamethasone penetration. *Arch Ophthalmol*. 1989;107:1375- 80.

Ishibashi T, Miki K, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ. Effects of intravitreal administration of steroids on experimental subretinal neovascularization in the subhuman primate. *Arch Ophthalmol*. 1985;103:708-11.

Iverson D, Dailey W, Hartzler M. Pars plana lensectomy, vitrectomy and transvitreal diathermy in the rabbit eye: a model of PVR. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(Suppl):856.

Jaffe GJ, Ben-Nun J, Guo H, Dunn JP, Ashton P. Fluocinolone acetonide sustained drug delivery device to treat severe uveitis. *Ophthalmology*. 2000a;107:2024-33.

Jaffe GJ, Pearson PA, Ashton P. Dexamethasone sustained drug delivery implant for the treatment of severe uveitis. *Retina*. 2000b;20:402-3.

Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-90.

JÄRVINEN K, JÄRVINEN T, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Del Rev*.1995;16:3-19.

Jennings T, Rusin MM, Tessler HH, Cunha-Vaz JG. Posterior sub-Tenon's injections of corticosteroids in uveitis patients with cystoid macular edema. *Jpn J Ophthalmol*. 1988;32:385-91.

Jonas JJ, Akkoyun I, Budde WM, Kreissig I, Degenring RF. Intravitreal Re-injection of Triamcinolone for Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:218-22.

Karacorlu M, Ozdemir H, Karacorlu S. Intravitreal triamcinolone acetonide for the treatment of chronic pseudophakic cystoid macular oedema. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003;81:648-52.

Kato A, Kimura H, Okabe K, Okabe J, Kunou N, Ogura Y. Feasibility of Drug Delivery to the Posterior Pole of the Rabbit Eye with an Episcleral Implant . *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004;45:238-44.

Kimura H, Ogura Y, Hashizoe M, Nishiwaki H, Honda Y, Ikeda Y. A new vitreal drug delivery system using an implantable biodegradable polymeric device. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35:2815-9.

Kimura H, Ogura Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica*. 2001;215:143-55.

Knepper PA, Breen M, Weinstein HG, Blacik LJ. Intraocular pressure and glycosaminoglycan distribution in the rabbit eye: influence of age and dexamethasone. *Exp Eye Res*. 1978;27:567-75.

Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol.* 1987;139:4129-34.

Krepler K, Ergun E, Sacu S, Richter-Muksch S, Wagner J, Stur M, Wedrich A. Intravitreal triamcinolone acetonide in patients with macular oedema due to central retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005;83:71-5.

Kumta SM, Spinner R, Leung PC. Absorbable intramedullary implants for hand fractures: animal experiments and clinical trial. *J Bone Joint Surg Br.* 1992;4:5636.

Kunou N, Ogura Y, Hashizoe M, Honda Y, Hyon SH, Ikada Y. Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implants in rabbits. *J Control Release* 1995;37:143-50.

Kunou N, Ogura Y, Honda Y, Hyon SH, Ikada Y. Biodegradable scleral implant for controlled intraocular delivery of betamethasone phosphate. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:635-41.

Kwak HW, D'Amico DJ. Evaluation of the retinal toxicity and pharmacokinetics of dexamethasone after intravitreal injection. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:259-66.

Lam TT, Fu J, Tso MO. A histopathologic study of retinal lesions inflicted by transescleral iontophoresis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1991;229:389-94.

Laties AM, Rapoport S. The blood-ocular barriers under osmotic stress. Studies on the freeze-dried eye. *Arch Ophthalmol.* 1976;94:1086-91.

Lederer Jr, Harold RE. Drop size of commercial glaucoma medications. *Am J Ophthalmol.* 1986;101:691-4.

Lee SW, Tsou AP, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugui EM, Allison AC. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 R gene and decrease the stability of interleukin 1 R mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:1204-8.

Lee YH, Kompella UB, Lee VHL. Systemic absorption pathways of topically applied beta adrenergic antagonists in the pigmented rabbit. *Exp Eye Res.* 1993;57:341-9.

Lee, VHL; Robinson, JR. Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits. *J Pharm Sci.* 1979;68:673-84.

Leibowitz HM, Kupferman A. Anti-inflammatory medications. *Int Ophthalmol Clin.* 1980;20:117-34.

Leopold IH, Purnell JE, Camon EJ. Local and systemic cortisone in ocular disease. *Am J Ophthalmol.* 1951;34:361-71.

Leopold IH. Nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory agents. In: Sears ML, Tarkkanen A, editors. *Surgical pharmacology of the eye.* New York: Raven Press; 1958. p.83-133.

Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasian M, Langer R, editors. *Biodegradable polymers as drug delivery systems.* New York: Marcel Dekker; 1990. p. 01-41.

Lewis GD, Campbell WB, Johnson AR. Inhibition of prostaglandin synthesis by glucocorticoids in human endothelial cells. *Endocrinology.* 1986;119:62-69.

Liang HC, Hui YN, Cai YS. [Triamcinolone acetonide in the prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy] *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 1994;30:122-4. Chinese.

Liem MD, Zegel HG, Balduini FC, Turner ML, Becker JM, Caballero-Saez A. Repair of Achilles tendon ruptures with a polylactic acid implant: assessment with MR imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 1991;156:769-73.

Marchal-Heussler L, Fessi H, Devissaguet JP, Hoffman M, Maincent P. Colloidal drug delivery systems for the eye: A comparison of the efficacy of three different polymers: poly-isobutylcyanoacrylate, polylactic-co-glycolic acid, poly-epsilon-caprolacton, *STP Pharma Sci.* 1992;2:98-104.

Marchal-Heussler L, Sirbat D, Hoffman M, Maincent P. [Nanocapsules of beta-blocking agents: a new drug carrier in ophthalmology. Application to medical treatment of glaucoma in rabbits]. *J Fr Ophtalmol*. 1991;14(6-7):371-5. French.

Martidis A, Duker JS, Greenberg PB, Rogers AH, Puliafito CA, Reichel E, Bauman C. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2002;109:920-7.

Martinez-Palomo A, Eriq D. Structure of *tight junctions* in epithelia with different permeability. *Proc Natl Acad Sci*. 1975;72:4487-91.

Maurice DM, Mishima S. Ocular pharmacokinetics. In: MC Sears, editor. *Handbook of Experimental Pharmacology. Pharmacology of the Eye*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg. 1984; p. 16-116.

Maurice DM, Polgar J. Diffusion across the sciera. *Exp Eye Res*. 1977;25:577-82.

Merkli A, Tabatabay C, Gurny R, Heller J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Prog Polym Sci*. 1998;23:563-80.

Morita Y, Ohtori A, Kimura M, Tojo K. Intravitreal delivery of dexamethasone sodium m-sulfobenzoate from poly(DL-lactic acid) implants. *Biol Pharm Bull*. 1998;21:188-90.

Moritera T, Ogura Y, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Microspheres of biodegradable polymers as a drug delivery system in the vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32:1785-90.

Moritera T, Ogura Y, Yoshimura N, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:3125-30.

Munton CG, Phillips CI, Martin B, Bartholomew RS, Capperauld I. Vicryl (Polyglactin 910): a new synthetic absorbable suture in ophthalmic surgery. A preliminary study. *Br J Ophthalmol*. 1974;58:941-7.

Nussenblatt RB, Palestine AG. Uveitis, Fundamentals and Practice. Chicago: Yearbook Medical Publishers; 1989:104-16.

Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, Hayano M, Murota SI, Mochizuki M. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol.* 2001;189:323-33.

Okabe J, Kimura H, Kunou N, Okabe K, Kato A, Ogura Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intraocular delivery of betamethasone phosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:740-4.

Okada H, Doken Y, Ogawa Y. Persistent suppression of the pituitary-gonadal system in female rats by three-month depot injectable microspheres of leuporelin acetate. *J Pharm Sci.* 1996;85:1044-8.

Okada H, (noue Y, Heya T, Ueno H, Ogawa Y, Toguchi H. Pharmacokinetics of once-a-month injectable microspheres of leuprolide acetate. *Pharm Res.* 1991;8:787-91.

Olsen TW, Aaberg SY, Geroski DH, Edelhauser HF. Human sciera: thickness and surface area. *Am J Ophthalmol.* 1998;125:237-41.

Olsen TW, Edelhauser HF, Lim JI, Geroski DH. Human scierai permeability. Effects of age, cryotherapy, transescleral diode laser, and surgical thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:1893-1903.

Paganelli F, Cardillo JA, Melo LA Jr, Oliveira AG, Skaf M, Costa RA; Brazilian Ocular Pharmacology and Pharmaceutical Technology Research Group. A single intraoperative sub-Tenon's capsule triamcinolone acetate injection for the treatment of post-cataract surgery inflammation. *Ophthalmology.* 2004;111:21028.

Pearson PA, Jaffe GJ, Martin DF, Cordahi GJ, Grossniklaus H, Schmeisser ET, Ashton P. Evaluation of delivery system providing long-term release of cyclosporine. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:311-7.

Peattie RA, Nayateb AP, Firpoc MA, Shelbyc J, Fisherd RJ, Prestwichb GD. Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants. *Biomaterials*. 2004;25:2789-98

Peiffer-Jr RL, Pohn-Thorsen L, Corcoran K. In: Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE, editors. *The Biology of the Laboratory Rabbit. Models in ophthalmology and vision research*. Chapter 19. 2. ed. Academic Press: New York; 1994. p.410-434.

Penfold PL, Wen L, Madigan MC, Gillies MC, King NJ, Provis JM. Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of the ECV304 cell line: implications for macular degeneration. *Clin Exp Immunol*. 2000;121:458-65.

Peyman GA, Moshfeghi DM. Intravitreal Triamcinolone Acetonide [Editorial]. *Retina*. 2004;24:488-90.

Phinney RB, Schwartz SD, Lee DA, Mondino BJ. Collagen-shield delivery of gentamicin and vancomycin. *Arch Ophthalmol*. 1988;106:1599-1604.

Rapoport SI. Osmotic opening of blood-brain and blood-ocular barriers. *Exp Eye Res*. 1977;25 Suppl:499-509.

Reidy JJ, Gebhardt BM, Kaufman HE. The collagen shield. A new vehicle for delivery of cyclosporine A to the eye. *Cornea*. 1990;9:196-9.

Robinson MR, Yuan P, Gogolak L, Tansey G, Smith J, Whitcup SM. Sustained-release biodegradable implants for long-term delivery of cyclosporine A [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40 Suppl:S40.

Sanborn GE, Anand R, Torti RE, Nightingale SD, Cal SX, Yates B, Ashton P, Smith T. Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. Use of an intravitreal device. *Arch Ophthalmol*. 1992;110:188-95.

Sasovetz D. Ketamine hydrochloride: an effective general anesthetic for use in electroretinography. *Ann Ophthalmol*. 1978;10:1510-4.

Schaeffer HE, Krohn DL. Liposomes in topical drug delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22:220-7.

Schindler RH, Chandler D, Thresher R, Macheimer R. The clearance of intravitreal triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol.* 1982;93:415-7.

Schleimer RP. The mechanism of anti-inflammatory steroid action in allergic disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;85:381-412.

Schoenwald RD. Ocular drug delivery. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1990;18:255-69.

Scholes GN, O'Brien WJ, Abrams GW, Kubicek MF. Clearance of triamcinolone from vitreous. *Arch Ophthalmol.* 1985;103:1567-9.

Singer KL, Stevenson BR, Woo PL, Firestone GL. Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 1994;269:16108-15.

Singerman LJ, Miller DG. Pharmacological Treatments for AMD. *Rev Ophthalmol.* [periódico na Internet. 2003 [cited 2005 Feb 02]; 10 [cerca de 6p.]. Disponível em: URL: http://www.revophth.com/index.asp?page=1_422.htm. [2005 Feb 02].

Sirbat D, Marchal-Heussler L, Hoffman M, Maincent P. [Ways to improve ocular bioavailability for topical applications]. *J Fr Ophtalmol.* 2000;23:505-9. French.

Smith JR, George RK, Rosenbaum JT. Lower eyelid herniation of orbital fat may complicate periocular corticosteroid injection. *Am J Ophthalmol.* 2002;133:845-7.

Smith TJ, Pearson PA, Blandford DL, Brown JD, Goins KA, Hollins JL, Schmeisser ET, Glavinovs P, Baldwin LB, Ashton P. Intravitreal sustained-release ganciclovir. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:255-8.

Tan DT, Chee SP, Lim L, Lim AS. Randomized clinical trial of a new dexamethasone delivery system (Surodex) for treatment of post-cataract surgery inflammation. *Ophthalmology*. 1999;106:223-31.

The United States Pharmacopeia. The national formulary. USP 27th revision (January 1, 2004). NF 22nd ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, Inc.; 2004.

Theng JTS, Ei TS, Zhou L, Lam KW, Chee SP, Tan D. Pharmacokinetic and toxicity study of an intraocular cyclosporine DDS in the anterior segment of rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:4895-9.

Toguchi H. Formulation study of leuprolerin acetate to improve clinical performance. *Clin Ther*. 1992;14:121-30.

Tremblay C, Barza M, Szoka F, Lahav M, Baum J. Reduced toxicity of liposome-associated amphotericin B injected intravitreally in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985;26:711-8.

Ungerstedt U. Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. In: Marsden CA, editor. *Measurement of neurotransmitter release in vivo*. Wiley; 1984. p. 81-104.

Urban RC Jr, Cotlier E. Corticosteroid-induced cataracts. *Surv Ophthalmol*. 1986;31:102-10.

Urtti A, Salminen L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Surv Ophthalmol*. 1993;37:435-56.

Velez G, Whitcup SM. New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular disease. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:1225-9.

Vollmer DL, Szlek MA, Kolb K, Lloyd LB, Parkinson TM. In vivo transescleral iontophoresis of amikacin to rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2002;18:549-58.

Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Lactic acid oligomer microspheres containing hydrophilic drugs. *J Pharm Sci.* 1990;79:919-24.

Waga J, Ehinger B. Passage of drugs through different intraocular microdialysis membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1995;233(1):31-7.

Waga J, Ohta A, Ehinger B. Intraocular microdialysis with permanently implanted probes in rabbit. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1991;69:618-24.

Watsky MA, Jablonski MM, Edelhauser HF. Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human. *Curr Eye Res.* 1988;7:483-6.

Weijtens O, Van der Sluijs FA, Schoemaker RC, Lentjes EG, Cohen AF, RomijnFP, van Meurs JC. Peribulbar corticosteroid injection: vitreal and serum concentrations after dexamethasone disodium phosphate injection. *Am J Ophthalmol.* 1997;123:358-63.

Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann, RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:1-29.

Yang CS, Khawly JA, Hainsworth DP, Chen SN, Ashton P, Guo H, Jaffe GJ. An intravitreal sustained-release triamcinolone and 5-fluorouracil codrug in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:69-77.

Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Ogura Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52:25-36.

Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P, Honda Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23:253-81.

Yolles S, Eldridge JE, Woodland JHR. Sustained delivery of drugs from polymer/drug mixtures. *Polym News.* 1970;1:9-15.

Yoshikawa K, Kotake S, Ichiishi A, Sasamoto Y, Kosaka S, Matsuda H. Posterior sub-Tenon injections of repository corticosteroids in uveitis patients with cystoid macular edema. *Jpn J Ophthalmol.* 1995;39:71-6.

Yoshizumi MO, Bhavsar AR, Dessouki A, Kashani A. Safety of repeated intravitreal injections of antibiotics and dexamethasone. *Retina.* 1999;19:437-41.

Yuna YH, Goetz DJ, Yellena P, Chena W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials.* 2004;25:147-57

Zimmer A, Kreuter J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1995;16:61-73.