

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**FELIPE PLACENTINI PAES DE ALMEIDA**

**Estudo da farmacocinética vítrea e toxicidade da  
ciclosporina intravítrea em olhos de coelhos**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2012**

**FELIPE PLACENTINI PAES DE ALMEIDA**

**Estudo da farmacocinética vítrea e toxicidade da  
ciclosporina intravítrea em olhos de coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Mecanismos  
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e  
Audiovestibular.

**Orientador: Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2012**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Felipe Piacentini Paes de

Estudo da farmacocinética vítrea e toxicidade da ciclosporina intravítrea em olhos de coelhos. Ribeirão Preto, 2012.

92p.: 21il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audiovestibular.

Orientador: Messias, André Márcio Vieira

1. Implantes intravítreos 2. Ciclosporina; 3. Eletrorretinografia; 4. Toxicidade retiniana; 5. Farmacocinética intraocular.

## Dedicatória

Aos meus pais.

## Orientadores

Ao Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias, pela paciência,  
confiança e pelo entusiasmo.

&

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge, pela oportunidade e pelos  
ensinamentos.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias, meu amigo e professor, pela orientação e pelo empenho neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge, pelas oportunidades oferecidas, pelo compartilhamento de seus conhecimentos e incentivo à pesquisa e ao estudo da oftalmologia.

Ao Prof. Armando da Silva Cunha Jr. e à Dra Juliana Barbosa Saliba, da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela valiosa colaboração na manufatura do implante e na obtenção de importantes resultados da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antônio Haddad, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP, pela importante contribuição na obtenção das imagens histológicas.

Ao Prof. Alfredo Maia, ao veterinário Felipe Curti e ao Hospital Veterinário - UNIRP, pelo auxílio no manuseio com os animais.

Ao Dr. Rubens Siqueira, pelos ensinamentos e aprimoramentos da técnica cirúrgica, além do incentivo a essa pesquisa.

Ao amigo e colega Jefferson Augusto Ribeiro Santana, pela importante colaboração nesta pesquisa.

À Dra. Angélica Gobbi Jorge e Vani Alves Correia, pelas condições que proporcionaram para o estudo histológico.

Aos amigos do Departamento de Oftalmologia: Cecília, Rita, Rogério, Edson Beragua e Edson Lima.

Ao técnico em Cirurgia Experimental da FMRP-USP - Hermes Murtha Oliveira que, com muita dedicação, me auxiliou nas cirurgias, nos exames e no acolhimento dos coelhos.

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

À CAPES, ao CNPQ e à FAEPA, pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

**RESUMO**

---



ALMEIDA, F. P. P. **Estudo da farmacocinética vítrea e toxicidade da ciclosporina intravítrea em olhos de coelhos**. 92f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O tratamento de pacientes com doenças inflamatórias oculares crônicas frequentemente implica no uso prolongado de drogas anti-inflamatórias sistêmicas como corticosteroides e outros imunossupressores, podendo acarretar efeitos colaterais importantes. O uso local destas drogas pode contribuir para aumentar seus efeitos desejáveis e reduzir os colaterais. Implantes intraoculares biodegradáveis são capazes de disponibilizar o fármaco diretamente na cavidade vítrea em doses terapêuticas por período prolongado. O copolímero do ácido láctico e glicólico (PLGA) é um clássico exemplo entre os polímeros sintéticos biodegradáveis aplicados em sistemas de liberação de fármacos devido à sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade em testes *in vivo*. A ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor largamente utilizado na clínica médica, e também tem sido empregada no tratamento de várias doenças inflamatórias intraoculares. O objetivo deste estudo foi avaliar a farmacocinética vítrea da CsA, quando aplicada por meio de implante biodegradável de PLGA intravítreo na concentração de 350 µg em olhos de coelhos, assim como avaliar a ocorrência de toxicidade retiniana causada pela presença intraocular do sistema de liberação de fármacos por meio de eletrorretinografia (ERG) e histopatologia. Dos sessenta coelhos que foram utilizados neste estudo, 38 receberam o implante intravítreo de PLGA contendo CsA e 22 somente os veículos. Somente o olho direito dos coelhos foi analisado na pesquisa. O estudo teve duração de oito semanas. Quatro coelhos do grupo CsA e dois do grupo controle foram sacrificados semanalmente para a coleta do vítreo e posterior estudo farmacocinético. Quatro animais de cada grupo foram escolhidos para terem a pressão intraocular aferida semanalmente. Seis coelhos foram submetidos à ERG no início e ao final do estudo, sendo então sacrificados, e os olhos processados para estudos histológicos da retina. O período inferido de permanência da CsA na cavidade vítrea foi de 17 semanas. Nos dois grupos, com e sem CsA, não foram observadas alterações histológicas na retina, entretanto houve importante redução da onda b nas fases escotópicas da ERG no grupo CsA, indicando toxicidade na via dos bastonetes após as oito semanas de seguimento. Em resumo, estes resultados mostraram que a CsA aplicada por meio de implantes oculares de PLGA na dose de 350 µg não causa alterações histológicas da retina, mas provoca um padrão exclusivo de diminuição da onda b. Em estudos futuros, seria interessante avaliar os efeitos de implantes contendo concentrações inferiores a 350 µg de CsA, e também, veículos que permitam que sua liberação seja mais lenta, evitando-se, assim, a toxicidade observada nos ERGs e confirmar sua aplicabilidade clínica como alternativa interessante para o tratamento de doenças oculares inflamatórias crônicas.

**Palavras-chave:** Retina, Coelho, Eletrorretinografia, Implantes biodegradáveis, Ciclosporina, Farmacocinética intravítrea.

**ABSTRACT**

---

ALMEIDA, F. P. P. **Pharmacokinetic and toxicity study of intravitreal cyclosporine in rabbits eyes.** 92f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Treatment of patients with chronic inflammatory ocular diseases often involves the use of systemic anti-inflammatory drugs such as corticosteroids and other immunosuppressive agents for a long period of time, which may cause significant systemic side effects. Intraocular use of these drugs may help to improve their local beneficial effects and reduce systemic adverse effects. Biodegradable intraocular implants are able to deliver drugs directly into the vitreous cavity in therapeutic doses for an extended period of time. Poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) is a good example of synthetic biodegradable polymers used in ocular drug delivery systems due to its biocompatibility and absence of toxicity. Cyclosporine A (CsA) is a largely used immunosuppressor, and it has also been employed for treatment of various intraocular inflammatory diseases. The objective of this work was to evaluate the pharmacokinetics of CsA, when applied in biodegradable PLGA intravitreal implants in rabbit eye and its retina toxicity by electroretinography and histopathology. Right eyes of sixty rabbits were used on this study, 38 received the PLGA implant containing 350 µg of CsA, and 22 the implant without the drug and were followed during 8 weeks. Four animals of CsA group and 2 of control group were sacrificed weekly to have their vitreous samples collected for subsequent pharmacokinetic study. Four animals from each group were chosen to have intraocular pressure measured weekly. Six animals of each group underwent electroretinography tests at baseline and at the end of the study. Then they were sacrificed and had their eyes processed for histological studies of the retina. It was hypothetically calculated that CsA would take 17 weeks to be completely delivery by this system. Histologically the retina did not show alterations in both groups, but there was a significant reduction in the b wave of the scotopic ERG phases in the CsA group indicating toxicity of the rods pathway after 8 weeks of follow-up. In summary, PLGA implants with 350 µg of CsA does not cause retinal histological changes, but decreases b wave amplitude. In future studies it would be interesting to test lower concentrations of CsA using this delivery system to decrease possible toxicity and to guarantee its clinical applicability.

**Keywords:** Retina, Rabbit, Electroretinography, Biodegradable implant, Intravitreal drug delivery, Cyclosporine, Intravitreous pharmacokinetic.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b>	Esquema ilustrando os tipos celulares componentes da retina ...	24
<b>Figura 2:</b>	Corte histológico da retina mostrando suas 10 camadas .....	25
<b>Figura 3:</b>	Esquema de um fotorreceptor (bastonete) ilustrando a fototransdução .....	27
<b>Figura 4:</b>	<b>(A)</b> Esquema mostrando as correntes extracelulares geradas após estimulação luminosa da retina; <b>(B)</b> Circuito elétrico mostrando o local de aquisição do potencial elétrico do ERG e as principais resistências elétricas envolvidas.....	28
<b>Figura 5:</b>	Típica resposta elétrica medida no ERG de campo total, após estimulação da retina de animal (rato) adaptado ao escuro .....	29
<b>Figura 6:</b>	Implante de polímero PLGA desenvolvido na UFMG, usado em vítreo de olho de coelho como veículo para liberação de Ciclosporina A .....	45
<b>Figura 7:</b>	Desenho experimental ilustrando os dois grupos de animais estudados, com CsA e controle, e os procedimentos realizados .....	47
<b>Figura 8:</b>	Implante intraocular (ponta da seta) retirado após a enucleação do olho de coelho na semana 1 do estudo.....	50
<b>Figura 9:</b>	Exemplos de formas de ondas das respostas elétricas registradas no protocolo padrão internacional de eletrofisiologia da visão (ISCEV) .....	54
<b>Figura 10:</b>	Eletrorretinograma (ERG). <b>(A)</b> posicionamento do animal para o ERG, <b>(B)</b> eletrodo JET colocado na superfície ocular .....	55
<b>Figura 11:</b>	Porcentagem semanal de liberação da CsA do implante de PLGA no vítreo de coelhos, durante oito semanas .....	59
<b>Figura 12:</b>	Massa do implante de PLGA em vítreo de coelho durante oito semanas .....	60
<b>Figura 13:</b>	Quantidade de CsA presente no vítreo de coelhos que receberam implante de PLGA .....	61
<b>Figura 14:</b>	Aspecto clínico do implante de PLGA inserido na cavidade vítrea no olho de coelho duas semanas após o procedimento cirúrgico .....	62

<b>Figura 15</b>	Variação da pressão intraocular em olhos de coelhos que receberam implantes de PLGA com e sem CsA durante oito semanas .....	63
<b>Figura 16a:</b>	Corte histopatológico da retina de coelho do grupo controle corado com azul de toluidina .....	64
<b>Figura 16b:</b>	Corte histopatológico da retina de coelho do grupo CsA corado com azul de toluidina .....	64
<b>Figura 17:</b>	ERG de olhos de coelhos com implante de PLGA com e sem CsA aplicada no vítreo após adaptação ao escuro. ....	66
<b>Figura 18:</b>	Amplitude e latência da onda b nas intensidades de luminância de 0,01, 3,0 e 10,0 cd.s/m <sup>2</sup> .....	68
<b>Figura 19:</b>	Amplitude e latência da onda a sem alterações nas intensidades de luminância de 3 e 10 cd.s/m <sup>2</sup> .....	69
<b>Figura 20:</b>	Exemplos de respostas obtidas no ERG após adaptação à claridade .....	70
<b>Figura 21:</b>	Resposta da onda b (amplitude e latência) na fase “Cone” (3,0 cd.s/m <sup>2</sup> com fundo de 30 cd/m <sup>2</sup> ) e resposta ao estímulo 30Hz <i>Flicker</i> .....	71

## **LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1:</b> Média $\pm$ erro padrão do ERG escotópico no exame inicial (S0) e na semana 8 (S8) de seguimento nos animais dos grupos controle e com CsA.....	67
<b>Tabela 2:</b> Média $\pm$ erro padrão das respostas do ERG aos estímulos de 3,0 cd.s/m <sup>2</sup> com fundo de 30 cd/m <sup>2</sup> (fase Cone) e o 30 Hz <i>Flicker</i> no exame inicial (S0) e na semana 8 (S8) de seguimento.....	70



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

<b>°C-</b>	Grau centígrado
<b>µg-</b>	Micrograma
<b>µV-</b>	MicroVolt
<b>ACN-</b>	Acetonitrila
<b>ARVO-</b>	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
<b>cd.seg/m<sup>2</sup>-</b>	Candela por segundo por metro quadrado
<b>cd/m<sup>2</sup>-</b>	Candela por metro quadrado
<b>CETEA-</b>	Comitê de Ética em Experimentação Ambiental
<b>CLAE-</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CMV-</b>	Citomegalovírus
<b>CsA-</b>	Ciclosporina A
<b>CSNB-</b>	<i>Congenital stationary night blindness</i>
<b>DMRI-</b>	Degeneração macular relacionada à idade
<b>EPR-</b>	Epitélio pigmentar da retina
<b>ERG-</b>	Eletrorretinograma
<b>FDA-</b>	<i>Food Drug Administration</i>
<b>FMRP-</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<b>FO-</b>	Exame de fundo de olho realizado com oftalmoscópio binocular indireto
<b>g-</b>	grama
<b>Hz-</b>	Hertz
<b>IFN-γ-</b>	Interferon gama
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>ISCEV-</b>	International Society for Clinical Electrophysiology of Vision

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

<b>K-</b>	Kelvin
<b>Kg-</b>	Quilograma
<b>LF-</b>	Exame de biomicroscopia de luz (lâmpada de fenda)
<b>M-</b>	molar
<b>mg-</b>	Miligrama
<b>mL-</b>	Mililitro
<b>mm-</b>	Milímetro
<b>mmHg-</b>	Milímetros de mercúrio
<b>mRNA-</b>	RNA mensageiro
<b>MS-</b>	Detector de massa
<b>MS-</b>	Milisegundo
<b>MΩ-</b>	Megaohm
<b>NFAT-</b>	Fator nuclear de células T ativado
<b>ng-</b>	Nanograma
<b>PGA-</b>	Copolímero do ácido glicólico
<b>PIO-</b>	Pressão intraocular
<b>PLA-</b>	Copolímero do ácido lático
<b>PLGA 50:50-</b>	Copolímero do ácido lático e glicólico, 50% ácido lático e 50% ácido glicólico
<b>PLGA 75:25-</b>	Copolímero do ácido do ácido lático e glicólico, 75% ácido lático e 25% ácido glicólico
<b>PLGA 85:15-</b>	Copolímero do ácido lático e glicólico, 85% ácido lático e 15% ácido glicólico
<b>PLGA-</b>	Copolímero do ácido lático e glicólico
<b>PO-</b>	Potenciais oscilatórios

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

<b>PVA-</b>	Álcool polivinílico
<b>PVA-EVA-</b>	Polivinil-álcool/acetato de vinil etileno
<b>PVPI-</b>	Solução tópica de iodopovidona
<b>SFL-</b>	Sistema de liberação de fármacos
<b>UFMG-</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>USP-</b>	Universidade de São Paulo
<b>UV-</b>	Ultravioleta
<b>VEGF-</b>	Fator de crescimento endotelial vascular

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
1.1. Anatomia retiniana .....	23
1.2. Eletrofisiologia visual.....	26
1.3. Ciclosporina .....	29
1.4. Vias de administração de drogas para o tratamento de doenças oculares .....	32
1.4.1. Injeções intravítreas de medicamentos.....	33
1.5. Implantes intraoculares como sistemas de liberação controlada no vítreo .....	34
1.5.1. Implantes oculares não-biodegradáveis.....	34
1.5.2. Implantes oculares biodegradáveis.....	35
1.5.3. Sistemas de liberação de fármacos contendo CsA .....	37
1.6. O olho como receptor de implantes.....	39
1.7. Justificativa do estudo .....	40
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
3.1. Implantes <b>de PLGA</b> .....	44
3.2. Animais .....	45
3.3. Coleta e dosagens do material.....	48
3.3.1. Procedimento cirúrgico .....	48
3.3.2. Obtenção do vítreo.....	48
3.3.3. Quantificação de ciclosporina no vítreo .....	48
3.3.4. Determinação da quantidade total de CsA liberada no vítreo e remanescente nos implantes retirados .....	49
3.3.5. Avaliação da degradação da matriz polimérica do implante.....	49
3.3.6. Determinação da taxa de eliminação da CsA do vítreo e do tempo de meia-vida do fármaco.....	50
3.4. Avaliação da segurança do implante intravítreo e sua toxicidade retiniana.....	51
3.4.1. Observações clínicas .....	51
3.4.2. Estudo histopatológico.....	51
3.4.3. Eletrorretinografia. Protocolo padrão da ISCEV (Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão).....	52
3.4.4. Eletrorretinografia em olhos de coelho .....	54
3.5. Análise estatística .....	56
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
4.1. Farmacocinética da CsA e degradação do Implante.....	58
4.1.1. Liberação da CsA no vítreo.....	58
4.1.2. Degradação do implante no vítreo .....	59
4.1.3. Concentração da CsA no vítreo .....	60
4.2. Observação clínica e exames oftalmológicos.....	61
4.3. Histologia da retina .....	63
4.4. Eletrorretinografia .....	65
4.4.1. ERG adaptado ao escuro.....	65
4.4.2. ERG adaptado ao claro.....	69

<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## **ANEXO DE PUBLICAÇÃO**

## 1- INTRODUÇÃO

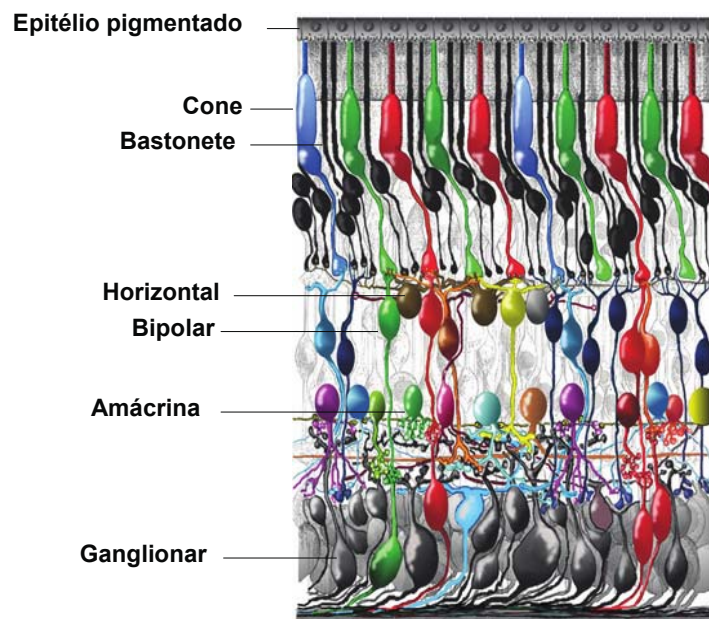
---

A visão é o sentido pelo qual os seres vivos processam o ambiente quanto à métrica do espaço, movimento, da cor, forma e do brilho, e a retina é a estrutura ocular fundamental na sua gênese, pois transforma a luz (energia eletromagnética) em estímulo nervoso por meio do processo de fototransdução. Inicialmente, uma breve introdução dos aspectos estruturais e funcionais da retina será apresentado seguida de revisão da literatura com relação ao uso de CsA no tratamento de doenças oculares, particularmente em implantes intravítreos.

### **1.1. Anatomia retiniana**

Nos vertebrados, a retina é uma membrana localizada na superfície interna da parte posterior do olho, que contém os três primeiros neurônios da via visual aferente, dos quais, os cones e os bastonetes são células fotossensíveis que iniciam o processo da visão e se tornam hiperpolarizados na presença de luz. A partir daí, a informação visual segue por suas conexões com as células bipolares, o segundo neurônio, que processam os sinais em conjunto com as células horizontais e amácrinas e os enviam para as células ganglionares, o terceiro neurônio (Figura 1).

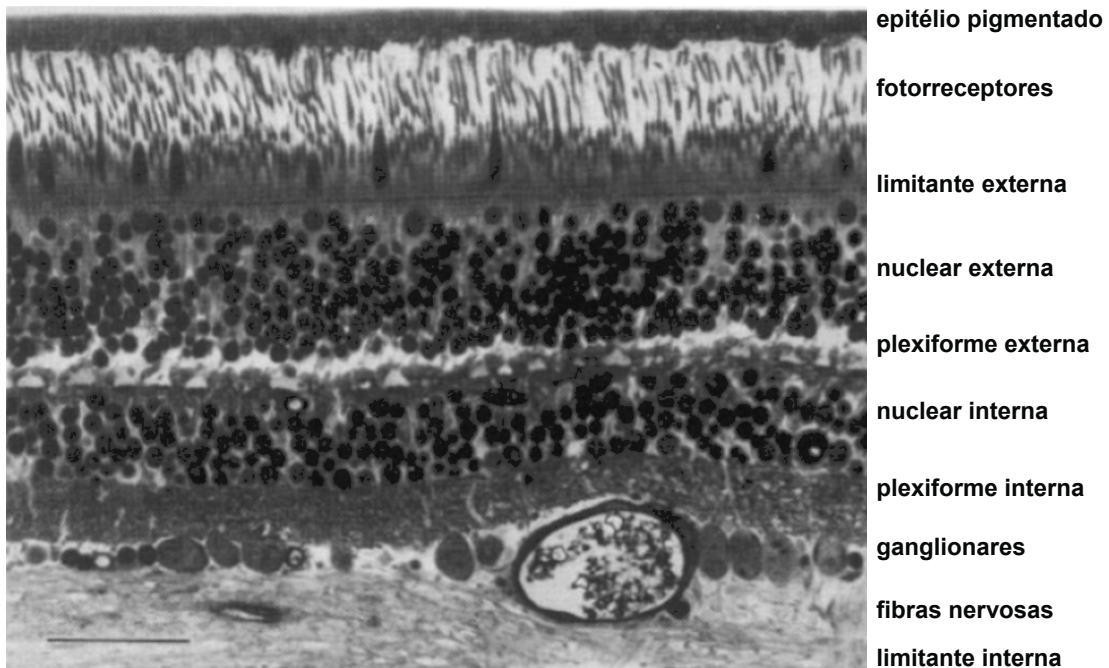




**Figura 1:** Esquema ilustrando os tipos celulares componentes da retina.  
Fonte: (<http://webvision.med.utah.edu/>).

Os axônios das células ganglionares formam o nervo óptico, que se estende até o corpo geniculado lateral. O conjunto de axônios dos neurônios do corpo geniculado lateral constitui as radiações ópticas, que fazem suas conexões sinápticas com os neurônios do córtex visual primário, ou com a área de associação visual (Kolb et al., 2001).

Histologicamente, a retina é dividida em 10 camadas: epitélio pigmentado (EPR), fotorreceptores, três camadas compostas por corpos celulares (nuclear externa, nuclear interna e células ganglionares), duas camadas intermediárias sinápticas (plexiforme interna e plexiforme externa) e a camada de fibras das células ganglionares (Figura 2). São consideradas, ainda, duas membranas limitantes: a externa, que não é uma membrana verdadeira e consiste no conjunto de complexos juncionais que unem as células de Müller aos fotorreceptores no intervalo entre os seus segmentos externo e interno, e a interna, formada pela lâmina basal das células de Müller e que faz a interface da retina com a membrana hialoidea posterior do vítreo (Figura 2).



**Figura 2:** Corte histológico da retina mostrando suas 10 camadas.  
Fonte: (Foto cedida pelo Prof. Dr. André Messias)).

A camada nuclear externa é formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores. Seus prolongamentos sinápticos, juntamente com os das células bipolares, formam a camada plexiforme externa. Os corpos celulares das células bipolares estão situados na nuclear interna, que também é constituída pelas células amácrinas e horizontais.

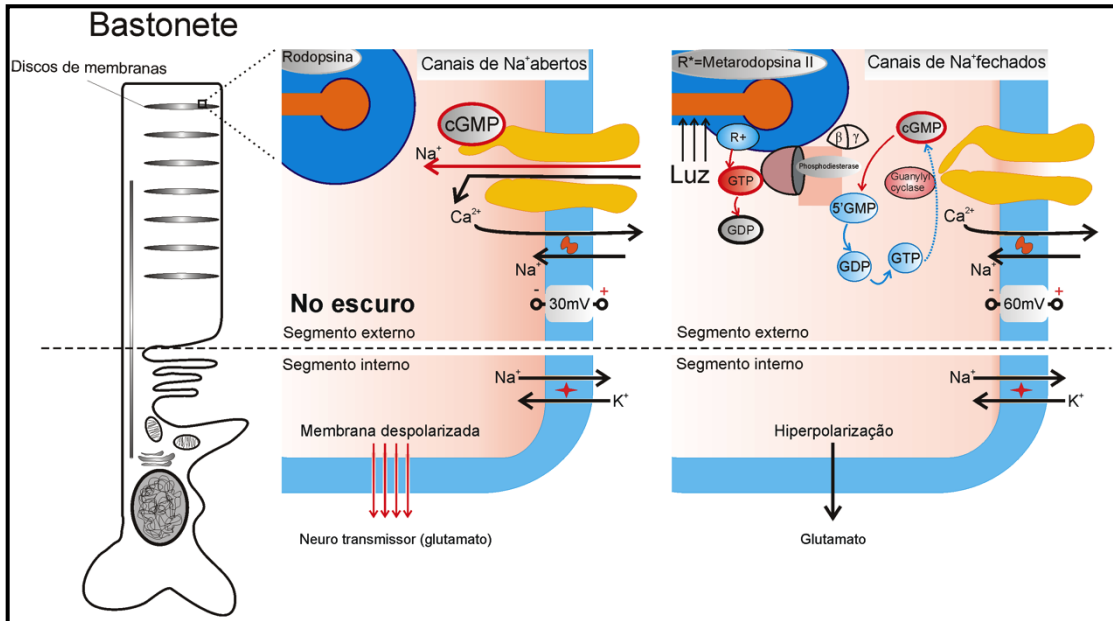
A segunda camada sináptica, a plexiforme interna, é responsável pela transmissão vertical da informação visual entre as células bipolares e ganglionares, e nela há também uma complexa rede moduladora, composta pelas células amácrinas e horizontais.

As células gliais são representadas pelos astrócitos, pela micróglia e principalmente pelas células de Müller, que formam o arcabouço de sustentação da retina e têm seus limites definidos entre as membranas limitante interna e externa. Têm também função protetora e de controle da homeostase retiniana.

## 1.2. Eletrofisiologia visual

No estágio que precede a chegada da luz, os fotorreceptores são mantidos parcialmente despolarizados por uma corrente elétrica, que é resultante, na sua maior parte, da abertura constante dos canais de íons  $\text{Na}^+$  (GMPc dependentes) no seu segmento externo, da bomba de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  presente no segmento interno, e de uma bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Ca}^{+2}$  presente no segmento externo, que mantém elevada a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$ . O fotorreceptor despolarizado libera constantemente o neurotransmissor glutamato em seu terminal sináptico com a célula bipolar (Lamb, Pugh, 2006) (Figura 3).

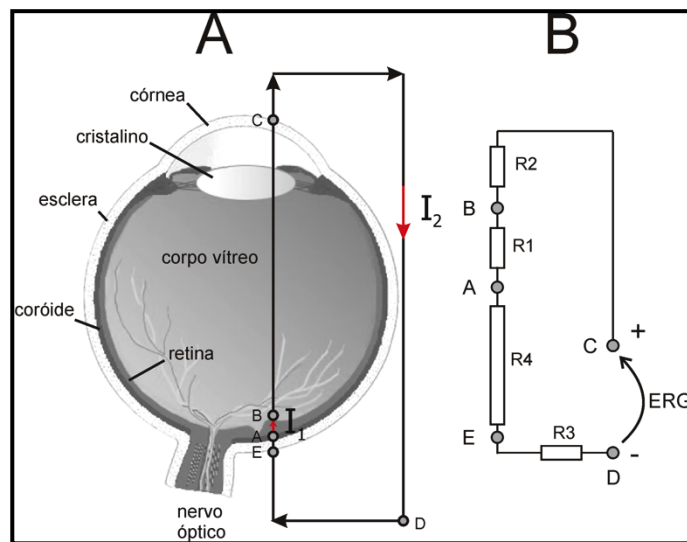
Quando um fóton de luz visível é absorvido por uma molécula de rodopsina, a energia absorvida causa a isomerização do seu cromóforo, o 11-cis *retinal* em sua forma trans, o 11-trans *retinal*. Essa reação inicia a transformação da rodopsina em metarodopsina II, que ativa uma proteína G heterotrimétrica, a transducina, provocando uma cascata de reações enzimáticas denominada fototransdução. Essas reações levam à diminuição da concentração intracelular de GMPc, que gera o fechamento dos canais  $\text{Na}^+$  na membrana do seguimento externo dos bastonetes causando sua hiperpolarização e a redução da liberação de glutamato no seu terminal sináptico com a célula bipolar, gerando a transmissão do estímulo visual (Lamb, Pugh, 2006) (Figura 3). Assim, se o potencial elétrico total gerado pela retina, após a exposição luminosa, fosse medido, ele seria composto por uma fase inicial negativa causada pela hiperpolarização dos fotorreceptores seguida por uma fase positiva, devido à despolarização das células bipolares. De fato, tal medida é conhecida por eletrorretinograma (ERG), que é utilizado como medida objetiva da função retiniana. O ERG é usado, principalmente, em diagnósticos clínicos de doenças retinianas degenerativas, reações tóxicas e avaliação funcional da retina em modelos animais e consiste basicamente no registro das alterações de potenciais elétricos na retina quando excitada pela luz.



**Figura 3:** À esquerda, esquema de um fotorreceptor (bastonete) mostrando os discos de membranas no segmento externo. Nos diagramas estão representadas as principais reações da cascata de ativação celular que ocorre após a absorção da luz.

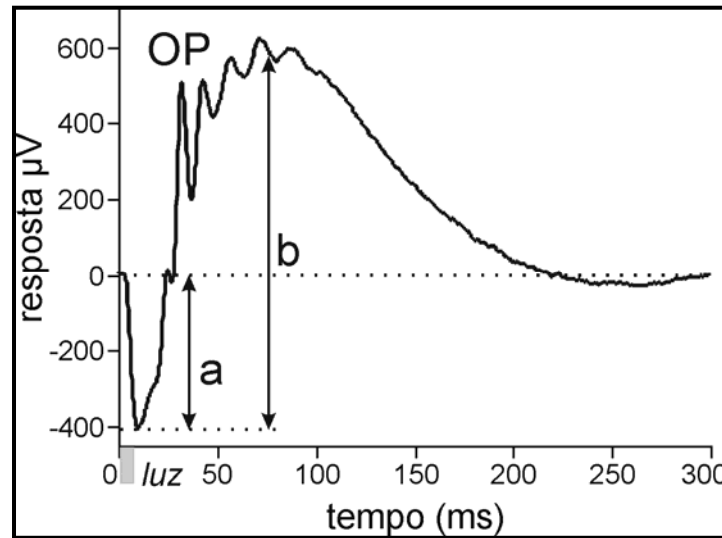
Fonte: (Foto cedida pelo Prof. Dr. André Messias).

No caso do ERG de campo total (para condições fotópicas é usado o ERG multifocal), a retina é iluminada uniformemente e por inteiro. Com eletrodos posicionados na córnea e outro na pele da têmpora ipsilateral, o que se mede é um potencial elétrico externamente ao olho, descrito como resposta em massa, pois é o resultado da interação das respostas elétricas produzidas por toda a matriz celular da retina. Um esquema simplificando o circuito elétrico formado durante o registro do ERG é mostrado na Figura 4, em que a retina representa a fonte de corrente gerada durante a apresentação da luz; que flui pelo vítreo, cristalino, humor aquoso, e pela córnea, sendo essas as resistências (ou impedâncias, para sinais elétricos alternados) do polo positivo. A retina, os tecidos extraoculares, a esclera, coróide e o EPR, compõem as resistências do polo negativo.



**Figura 4:** (A) Esquema mostrando as correntes extracelulares geradas após estimulação luminosa da retina: Entre os pontos A e B ocorre geração da corrente  $I_1$  até o ponto C. A corrente  $I_2$  atravessa as estruturas extraoculares voltando à esclera no ponto E, e o circuito se completa passando pela coróide, pelo epitélio pigmentado e pela retina. (B) Circuito elétrico mostrando o local de aquisição do potencial elétrico do ERG e as principais resistências elétricas envolvidas, onde R1 representa a resistência da retina, R2 do corpo vítreo, cristalino e da córnea, R3 das estruturas extraoculares e R4 (maior) do epitélio pigmentado.

Os principais componentes avaliados da resposta elétrica do ERG são: **onda a** (variação negativa do potencial elétrico da córnea gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores que ocorre após o início da exposição da retina a um *flash* de luz (Penn, Hagins, 1969); **onda b** (variação positiva do potencial resultante da despolarização das células bipolares); e **potenciais oscilatórios** (PO) (variações rápidas, ou de alta frequência, no potencial elétrico sobrepondo a onda b) (Figura 5). O ERG tem sido largamente utilizado para testar a toxicidade retiniana de substâncias em animais e humanos, sendo as medidas dos seus componentes (amplitudes e latências das ondas a, b e potenciais oscilatórios) consideradas parâmetros que indicam segurança de não toxicidade, ou quando alteradas revelam dano funcional causado pela exposição ao fármaco estudado (Messias et al., 2008).



**Figura 5:** Típica resposta elétrica medida no ERG de campo total, após estimulação da retina de animal (rato) adaptado ao escuro (12 horas) por um *flash* de luz de 4 ms de duração e luminância de 10 cd.s/m<sup>2</sup>. Inicialmente, a resposta apresenta uma variação negativa do potencial (onda a), gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores, e essa é seguida por uma variação positiva do potencial (onda b) creditada à despolarização das células bipolares. Sobrepondo a onda b, ocorrem variações rápidas do potencial elétrico chamado de potencial oscilatório, que é originário das camadas intermediárias da retina, principalmente nas células amácrinas.

### 1.3. Ciclosporina

O tratamento de pacientes com doenças oculares inflamatórias crônicas implica em longos períodos de administração de drogas anti-inflamatórias e imunossupressores como corticosteroides e agentes citotóxicos. Os efeitos adversos associados a essas terapias têm estimulado pesquisas para o desenvolvimento de estratégias alternativas (Nussenblatt et al., 1983).

A CsA é um potente imunossupressor produzido a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*, com ação inibitória específica contra as células T, bloqueando especificamente a transcrição de genes que codificam a produção de interleucina-2 (IL2), importante mediador inflamatório. A imunossupressão é reversível após o cessamento do seu uso. A ação

imunossupressora da CsA depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina. Este complexo é uma peptil-propil-isomerase que se liga e inibe a atividade da calcineurina-fosfatase, resultando na inibição da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e formação do linfócito T citotóxico (Cipriani, Farias, 2005). Uma dessas proteínas, o fator nuclear de células T ativado (NFAT), desloca-se para o núcleo, onde se liga à região promotora de genes IL2, interleucina-4 (IL4) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), causando a transcrição dos mesmos e a secreção das referidas citocinas. O bloqueio do NFAT é considerado, portanto, o principal efeito da CsA (Kahan, 1989, Fruman et al., 1992). Quanto ao sítio de ação imunorregulatório, a CsA é classificada como inibidora da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T. Ela tem a propriedade de circular associada às lipoproteínas, sendo metabolizada via citocromo p450 em pelo menos 25 metabólitos (Foxwell et al., 1990; Graham, 1994).

O uso sistêmico contínuo e em altas doses da CsA tem como principal efeito colateral a nefrotoxicidade (Barros et al., 1987, Remuzzi, Perico, 1995, Pirsch et al., 1997), decorrente de alteração da hemodinâmica glomerular com redução da filtração (Souza et al., 1992). Outros achados clínicos associados ao uso da CsA são: hipertensão arterial grave, síndrome urêmica hemolítica, hipercolesterolemia, hipertricose e hipertrofia gengival, além de hirsutismo, problemas neurológicos e diabetes melito (Friemann et al., 1998, Thorp et al., 2000).

Na oftalmologia, o seu uso tópico já se mostrou eficaz no tratamento de olho seco (Sall et al., 2000) e no controle pós-operatório de transplante de córnea (Algros et al., 2002). A via tópica de administração possibilita altas concentrações no epitélio corneano, mas a concentração da droga no segmento posterior é muito baixa (Mannermaa et al., 2006). A CsA também já foi utilizada em modelos animais na forma de implantes de liberação lenta, com diminuição da gravidade de uveíte experimental em cavalos, assim como no tratamento da uveíte secundária à doença de Behçet, uveítes por

sarcoidose e esclerites idiopáticas (Gilger et al., 2000). A CsA sistêmica já foi usada com sucesso para tratar pacientes com uveíte crônica não infecciosa, como doença de Behçet (Saricaoglu et al., 2004), outras formas de uveítes (Nussenblatt et al., 1985), síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (Fang, Yang, 2008), oftalmia simpática (Kilmartin et al., 1998) e retinocoroidopatia “birdshot” (Nussenblatt et al., 1983, Vitale et al., 1994). Diferentemente da terapia antitumoral e da prevenção de rejeição a transplantes, a CsA é utilizada na oftalmologia em doses sistêmicas diárias mais baixas (Donnenfeld, Pflugfelder, 2009). Estudos mostram sua eficácia no tratamento da uveíte posterior em adultos e crianças (Walton et al., 1998, Kulkarni, 2001, Lallemand et al., 2003). BenEzra e Maftzir (1990) demonstraram a distribuição da CsA no sangue, na saliva, lágrima, no humor aquoso e vítreo, após administração diária oral com 5 mg/kg (mg/kg/dia), ou por meio da aplicação tópica de 2% do fármaco.

A administração das formulações descritas acima para uso ocular local apresenta várias desvantagens, particularmente quando se analisa a disponibilização de CsA nas porções posteriores do bulbo do olho em doses efetivas. O fármaco, devido à sua baixa solubilidade em água (40 µg de CsA por ml de água), ao baixo coeficiente de partição óleo/água e à elevada massa molecular, não atravessa de forma satisfatória as barreiras teciduais e a barreira hematorretiniana ocular, apresentando, conseqüentemente, baixa penetrabilidade (Donnenfeld, Pflugfelder, 2009).

Como há inconvenientes na administração da CsA por vias convencionais para o tratamento da uveíte posterior resistente à terapia com corticoides, incluindo-se também seus efeitos tóxicos, é de interesse o desenvolvimento de novos sistemas de liberação do fármaco, que possibilitem a sua disponibilização de forma efetiva e segura, como os implantes intravítreos.



#### **1.4. Vias de administração de drogas para o tratamento de doenças oculares**

O tratamento de doenças oculares que acometem o vítreo e a retina é limitado pela baixa penetração das drogas até o segmento posterior do olho, devido à barreira protetora formada pelo epitélio corneano, e pelas perdas que ocorrem devido ao mecanismo de drenagem lacrimal (Velez, Whitcup, 1999, Mannermaa et al., 2006). Estima-se que menos de 5% do total dos princípios ativos instilados em forma de colírios penetrem efetivamente através da córnea. Sua maior parte é absorvida e cai na circulação sistêmica pelo estroma conjuntival, pelos vasos da margem palpebral e pelas mucosas nasal e nasofaríngea (Geroski, Edelhauser, 2001). As vias subconjuntival e subtenoniana são vistas como possíveis alternativas, pois elas proporcionam, em alguns casos, boa penetração transescleral da droga, porém não evitam que ocorra grande absorção sistêmica dos fármacos (Olsen et al., 1998, Ambati et al., 2000a,b).

Se a via sistêmica for a escolhida, altas dosagens serão necessárias para se alcançarem concentrações satisfatórias do medicamento no segmento posterior do olho, causando importantes efeitos colaterais sistêmicos (Axelrod, 1976, Mahalati et al., 1999, Gimnig et al., 2006). *Cushing* medicamentoso e Síndrome de Stevens-Johnson são exemplos de efeitos adversos do tratamento de doenças oculares tratadas sistemicamente como, por exemplo, na retinocoroidite por toxoplasmose (Axelrod, 1976, Gimnig et al., 2006).

Em casos em que altas concentrações de drogas no segmento posterior ocular são necessárias, a via mais comumente empregada é a injeção direta na cavidade vítrea, como no uso de anti-VEGF (Jorge et al., 2006), triancinolona (Paccola et al., 2008) e antibióticos (Roth, Flynn Jr., 1997). Entretanto, além dos riscos inerentes desse procedimento, como infecção, descolamento de retina e hemorragias, a curta meia-vida das drogas no vítreo frequentemente exige a repetição da aplicação para que se consiga manter níveis terapêuticos, multiplicando os riscos do procedimento, assim

como os riscos de toxicidade e o desconforto do paciente. Nesse contexto, é razoável inferir que sistemas que permitam liberação lenta e controlada de medicamentos dentro do olho poderiam representar alternativa eficiente no tratamento de doenças oculares que necessitem da manutenção de níveis terapêuticos das drogas por período prolongado no vítreo (Ambati et al., 2000b, Yasukawa et al., 2001).

#### **1.4.1. Injeções intravítreas de medicamentos**

Recentemente, tornou-se mais frequente o uso da via intravítrea para administração de drogas na oftalmologia, devido ao uso de antiangiogênicos como o Lucentis<sup>®</sup> (Ranibizumabe) e o Avastin<sup>®</sup> (Bevacizumabe) e esteroides como a Triamcinolona. Estes fármacos são injetados na cavidade vítrea para tratamento de doenças degenerativas e vasculares da retina, como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI), retinopatia diabética, e as oclusões vasculares.

Apesar dessas modalidades terapêuticas estarem vinculadas a repetidas injeções oculares, elas são as alternativas que oferecem bons resultados para as condições citadas. De forma geral, a via intravítrea pode ser considerada excelente para drogas usadas no tratamento de patologias retinianas, pois proporciona alta concentração intraocular dos fármacos próximo à retina. No entanto, nas doenças retinianas crônicas, há a necessidade de repetidas aplicações para o sucesso do tratamento, pois a eficaz eliminação das drogas no vítreo diminui rapidamente a concentração dos medicamentos em níveis subterapêuticos (Geroski, Edelhauser, 2000). Além do desconforto, que reduz a adesão dos pacientes aos tratamentos, o aumento do número de injeções intraoculares necessárias para o tratamento das patologias da retina implica no aumento das complicações inerentes ao procedimento. Uma alternativa seria criar um sistema intraocular de depósito que fosse seguro e proporcionasse uma liberação sustentada da droga com uma única administração, reduzindo, assim, os efeitos colaterais, o custo do tratamento e o desgaste aos quais pacientes e médicos são submetidos.

### **1.5. Implantes intraoculares como sistemas de liberação controlada no vítreo**

Sistemas de liberação de fármacos (SLF) poliméricos representam um método alternativo e viável para o alcance de níveis terapêuticos de fármacos no interior do olho. A sua aplicação é vantajosa, pois inseridos no vítreo, liberam o fármaco diretamente no local de ação de forma controlada e por tempo prolongado, ideal para pacientes com doenças oculares crônicas. Também têm o potencial de reduzir os efeitos adversos, frequentemente associados à administração de fármacos pela via intraocular ou sistêmica (Bourges et al., 2006, Fialho et al., 2008).

Os implantes intravítreos sólidos são capazes de disponibilizar moléculas de fármacos durante meses ou até anos, sendo boa alternativa para o tratamento de doenças crônicas intraoculares. Estes implantes são constituídos de materiais poliméricos inertes, atóxicos, não cancerígenos, hipoalergênicos e não desencadeiam respostas inflamatórias no local da aplicação (Athanasίου et al., 1996). Implantes não-biodegradáveis devem ser removidos cirurgicamente do olho após a liberação total do fármaco, o que representa risco adicional para o paciente e é uma desvantagem marcante desse tipo de sistema. Por esta razão, os polímeros biodegradáveis sintéticos têm sido amplamente investigados para o desenvolvimento de dispositivos de implantação intraocular.

#### **1.5.1. Implantes oculares não-biodegradáveis**

Implantes oculares não-biodegradáveis com liberação prolongada de fármacos foram os primeiros a serem utilizados na década de 1970 (Bourges et al., 2006). O Vitrasert<sup>®</sup> foi desenvolvido para liberar controladamente 4,5 mg de ganciclovir, por um período de 4-5 meses para tratamento de retinite por citomegalovírus (CMV) (Sanborn et al., 1992). Este implante não-biodegradável era constituído de um comprimido de ganciclovir recoberto por polímeros de polivinil-álcool/acetato de vinil etileno (PVA-EVA), sendo liberado para o uso em humanos em 1996 pelo *Food Drug Administration*

(FDA) (Ashton et al., 1992, Sanborn et al., 1992). Conforme os pacientes portadores de retinite por CMV alcançavam maior longevidade com a terapia antirretroviral, surgiram as complicações do uso prolongado do implante. Em abril de 2002, o mesmo foi retirado do mercado na Europa devido às complicações oculares ocorridas em 12% dos casos (principalmente hemorragias vítreas) (Lim et al., 1999).

O Retisert<sup>®</sup> (Bausch & Lomb, Rochester, NY), um implante intraocular de liberação controlada de acetato de fluocinolona, libera o fármaco por um período aproximado de 30 meses, e foi desenvolvido para o tratamento de uveítes não-infecciosas do segmento posterior do olho. O Retisert<sup>®</sup> reduziu significativamente a recorrência da doença e possibilitou a redução das terapias tópicas, sistêmicas e perioculares, além de melhorar a acuidade visual. A progressão da catarata e a necessidade de cirurgia em 100% dos casos, e o aumento da pressão intraocular (PIO) com necessidade de uso de medicação antiglaucomatosa em 78% dos casos e cirurgia filtrante em 40% dos casos foram os principais efeitos colaterais secundários decorrentes do uso do implante (Jaffe et al., 2006).

Em resumo, os implantes intraoculares não-biodegradáveis apresentam a vantagem de ter uma cinética previsível de liberação do fármaco por períodos prolongados. Além disso, elevadas concentrações do fármaco são alcançadas no vítreo, e baixos níveis são detectados no sangue. Porém, ao contrário dos implantes intraoculares biodegradáveis, estes sistemas devem ser removidos cirurgicamente do olho após a liberação total do fármaco, o que representa risco adicional ao paciente. Por esta razão, diversos estudos visam o desenvolvimento de implantes intraoculares de liberação controlada de fármacos constituídos de polímeros biodegradáveis.

### **1.5.2. Implantes oculares biodegradáveis**

Vários tipos de polímeros biodegradáveis têm sido estudados para o desenvolvimento dos implantes. Os polímeros naturais têm alto custo e pureza questionáveis. Dentre os sintéticos, destacam-se polímeros dos ácidos

lático e glicólico como o copolímero de ácido glicólico (PGA), o copolímero de ácido lático (PLA) e o copolímero do ácido lático e glicólico (PLGA), que são poliésteres alifáticos, sujeitos à degradação por hidrólise enzimática ou não-enzimática. As ligações éster destes polímeros são suscetíveis à degradação hidrolítica nas condições fisiológicas, e os produtos de degradação gerados, os ácidos lático e glicólico, são metabólitos naturais do organismo, que entram no Ciclo de Krebs e, finalmente são metabolizados em gás carbônico e água (Yasukawa et al., 2005).

O implante de PLGA tem sido bastante estudado como biomaterial para liberação controlada de fármacos, já que este polímero apresenta taxas de degradação controláveis, excelente biocompatibilidade e aprovação do FDA para uso em humanos (Nair, Laurencin, 2006).

Implantes intraoculares contendo polímeros biodegradáveis como o PLGA podem ser preparados pelas técnicas de moldagem, extrusão e preparação de filmes. Na moldagem, o polímero e o fármaco podem ser aquecidos e submetidos à compressão em moldes de tamanho e forma desejados. Implantes preparados por compressão apresentam um perfil trifásico de liberação do fármaco: (1) a fase inicial é derivada da liberação de dose maior do fármaco presente na superfície da matriz polimérica, e é dependente da área superficial total do implante, da porcentagem de fármaco adicionada ao implante e da solubilidade aquosa desse fármaco. Portanto, quanto maior a área superficial do sistema, maior a concentração e hidrofília do fármaco adicionado e maior a probabilidade de ocorrência de efeitos tóxicos devido à exacerbação da fase inicial; (2) a fase de difusão, caracterizada pela liberação gradual do fármaco, devido à sua dissolução e erosão da superfície da matriz polimérica. Esta fase é regulada pela velocidade de degradação do polímero, área superficial total do implante, porcentagem de fármaco adicionado e solubilidade aquosa deste fármaco; (3) a fase final é caracterizada pela hidrólise no interior da matriz e liberação repentina de dose mais elevada de fármaco. A liberação de uma dose elevada de fármaco é possivelmente problemática e representa uma

desvantagem dos sistemas biodegradáveis (Yasukawa et al., 2002).

O Ozurdex<sup>®</sup> ou Posurdex<sup>®</sup> (Allergan, Inc, Irvine, CA) é um implante intravítreo biodegradável constituído de PLGA e dexametasona. Este sistema de liberação tem sido usado em pacientes que apresentam edema macular persistente, provocado por retinopatia diabética, oclusões venosas retinianas, uveítes posteriores não-infecciosas e Síndrome de Irvine-Gass, mantendo o efeito por mais de seis meses após a implantação. Kuppermann et al. (2007) pesquisaram a eficácia e segurança do Ozurdex<sup>®</sup>, concluindo que o implante contendo 700 µg trouxe melhora para a acuidade visual e foi bem tolerado pelos pacientes.

Fialho et al. (2006) prepararam implantes biodegradáveis de PLGA contendo 1.000 µg de dexametasona, visando o tratamento de desordens inflamatórias que acometem o segmento posterior do olho. Os implantes foram inseridos no vítreo de olhos de coelhos por meio de uma incisão via *pars plana*. O fármaco foi liberado por oito semanas, dentro da faixa terapêutica necessária para suprimir uma inflamação ocular (0,15 a 4,00 µg/ml). Além disso, ficou demonstrada a biocompatibilidade dos implantes, uma vez que reações tóxicas não foram observadas nas ERGs e exame histológico. Os resultados satisfatórios obtidos nesse estudo e a semelhança entre esses implantes e o Ozurdex<sup>®</sup> encorajam estudos adicionais para a aplicação clínica desses sistemas. Mais recentemente, o Sudorex<sup>®</sup> (Allergan, Inc, Irvine, CA), implante intraocular biodegradável feito de PLGA contendo dexametasona, está em fase III de estudos clínicos. Este implante está sendo desenvolvido para aplicação na câmara anterior dos pacientes submetidos à cirurgia de catarata, a fim de controlar a inflamação pós-operatória (Lee et al., 2010).

### **1.5.3. Sistemas de liberação de fármacos contendo CsA**

A CsA é efetiva para o tratamento de inflamação ocular severa do segmento posterior do olho quando administrada sistemicamente por injeções intravenosas ou oralmente (Masuda et al., 1989). Mas, há alguns anos,

pesquisadores estão buscando um sistema de liberação prolongada do fármaco, a fim de conseguir altas concentrações nos tecidos-alvo sem os indesejados efeitos colaterais. Microesferas feitas de PLGA 50:50 com CsA foram testadas na subconjuntiva em coelhos. Embora bem toleradas, não mostraram significativa diferença em sua ação/concentração na córnea, comparadas com formulações tópicas da droga; e córneas transplantadas foram mantidas sem rejeição pelo mesmo período de tempo com os dois tipos de aplicação (Harper et al., 1993, de Rojas et al., 1999). Por outro lado, implantes biodegradáveis subconjuntivais de PLGA com composição 85:15, contendo CsA, prolongaram a sobrevivência de córneas transplantadas em coelhos (Apel et al., 1995). Alghadyan et al. (1988) observaram que CsA ligada a lipossomo era segura em doses acima de 500 µg. Esse sistema, lipossomos/CsA na dose de 100 µg, foi injetado na cavidade vítrea, conseguindo-se altas concentrações de CsA por oito dias a mais do que a injeção isolada de CsA intravítrea, indetectável no 8º dia após a injeção.

A utilidade de implantes foi demonstrada em vários outros estudos. Dispositivos não-biodegradáveis de álcool polivinílico (PVA), contendo CsA, foram implantados na conjuntiva, e a concentração alcançada no vítreo foi de 500 ng/mL por seis meses (5 vezes maior do que a concentração terapêutica) (Pearson et al., 1996). Implantes de PVA-EVA intravítreo com dexametasona apresentaram liberação de 1,5 µg da droga por mais de dois meses em coelhos (Hainsworth et al., 1996). Implantes com acetato de triancinolona e 5-fluorouracil reduziram o descolamento tracional da retina, sem qualquer efeito tóxico nos animais (Yang et al., 1998).

Sistemas de liberação de drogas, que disponibilizam CsA no segmento posterior do olho, ainda são pouco explorados. Neste estudo, foi desenvolvido e avaliado *in vivo*, um novo implante de PLGA contendo CsA. A farmacocinética e o tempo de liberação da droga foram estudados, assim como a sua biocompatibilidade por meio de avaliações clínicas, histológicas e do perfil toxicológico do implante na função retiniana de coelhos.

## 1.6. O olho como receptor de implantes

O olho é um órgão com inúmeras vantagens para o uso de sistemas de liberação de drogas. É um compartimento fechado, com estruturas visualmente de fácil acesso e têm um sistema de circulação isolado pela barreira hematorretiniana interna e externa. Essas barreiras permitem uma liberação efetivamente local e ativa dos produtos. Além disso, a anatomia ocular apresenta amplo espaço para o uso de implantes (câmaras anterior e posterior), com grande superfície tecidual num pequeno volume, facilitando a absorção das drogas (Bourges et al., 2006). Apesar de algumas diferenças anatômicas, a retina de roedores tem sido muito utilizada como modelo para o estudo de toxicidade de substâncias, pois sua estrutura e seus potenciais elétricos gerados ao estímulo luminoso (ERG) se assemelham àsquelas da retina humana (Gjorloff et al., 2004).

Visando aumentar a eficácia do tratamento de doenças vitreoretinianas, sistemas de liberação lenta de drogas foram desenvolvidos, inicialmente, com um veículo não-biodegradável, que necessitava de subsequente remoção (Sanborn et al., 1992, Smith et al., 1992). Posteriormente, foram empregados materiais biodegradáveis e não-tóxicos, eliminando a necessidade da remoção do implante após a liberação intraocular da droga (Moritera et al., 1992).

Em doenças do segmento posterior do olho, há necessidade da liberação da droga diretamente na cavidade vítrea por meio de implantes de liberação lenta, com manutenção de níveis terapêuticos adequados por um longo período no seu local de ação, ou seja, no vítreo, na retina, ou coroide. Desta maneira, evitam-se os efeitos adversos associados aos tratamentos sistêmico e periocular; neste último, principalmente ptose e celulite. No entanto, assim como nas injeções intravítreas, o uso de implantes intraoculares implica em riscos inerentes ao procedimento cirúrgico, como hemorragias intraoculares e endoftalmites.



### **1.7. Justificativa do estudo**

O tratamento de pacientes com doenças inflamatórias oculares crônicas, geralmente é prolongado. O uso de drogas anti-inflamatórias sistêmicas como corticosteroides e outros agentes imunossupressores pode acarretar efeitos sistêmicos adversos importantes. O direcionamento do local de ação destas drogas pode contribuir para melhorar seus efeitos locais bem como reduzir os efeitos adversos sistêmicos. A CsA é uma droga imunossupressora, que tem sido empregada no tratamento de várias doenças inflamatórias intraoculares (Kilmartin et al., 1998, Nussenblatt et al., 1985, Saricaoglu et al., 2004, Vitale et al., 1994). Dessa forma, este estudo teve como objetivo estudar o comportamento de um implante intraocular biodegradável de PLGA contendo CsA em coelhos.

## **2. OBJETIVOS**

---

Objetiva o presente estudo:

- Determinar a farmacocinética da CsA no vítreo de coelhos que receberam 350  $\mu\text{g}$  da droga por meio de dispositivos biodegradáveis intraoculares de PLGA.
- Avaliar a ocorrência de alterações retinianas causadas pelo implante de PLGA isoladamente ou pela CsA contida no implante por meio de análise histológica e por ERG.

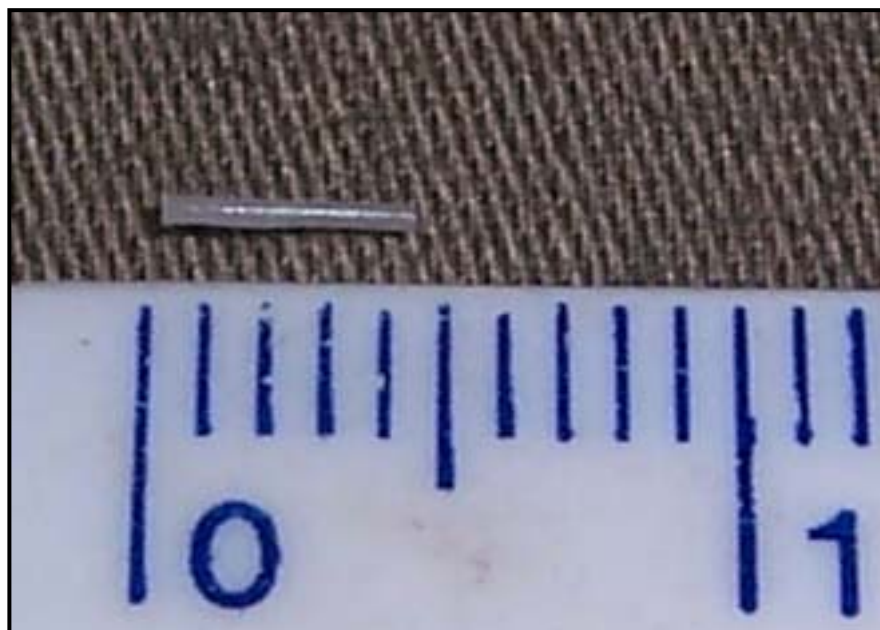
### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

O desenho experimental deste estudo consistiu, basicamente, da introdução cirúrgica na cavidade vítrea de olhos de coelhos de implantes de PLGA com e sem CsA. Num período de oito semanas foram realizadas avaliações clínicas, histológicas e por ERG de alterações causadas na retina. Também foi determinada a farmacocinética da CsA liberada pelo implante no vítreo e a cinética da decomposição do implante com e sem a droga.

### **3.1. Implantes de PLGA**

O implante de polímero PLGA 75:25 (75% ácido glicólico e 25% de ácido láctico) foi desenvolvido no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Saliba, 2011). A CsA é incorporada ao polímero, resultando em um sistema compacto, homogêneo e cilíndrico, composto por 68,4% de PLGA e 31,6% de CsA, com tamanho aproximado de 0,45 mm de diâmetro, 5 a 6 mm de comprimento, pesando cerca de 1,1 mg, contendo aproximadamente 353 µg de CsA (Figura 6). Implantes com tamanho e peso similares, mas sem a CsA, foram usados para implantação nos animais do grupo controle.



**Figura 6:** Implante de polímero PLGA desenvolvido na UFMG, usado em vítreo de olho de coelho como veículo para liberação de ciclosporina A.

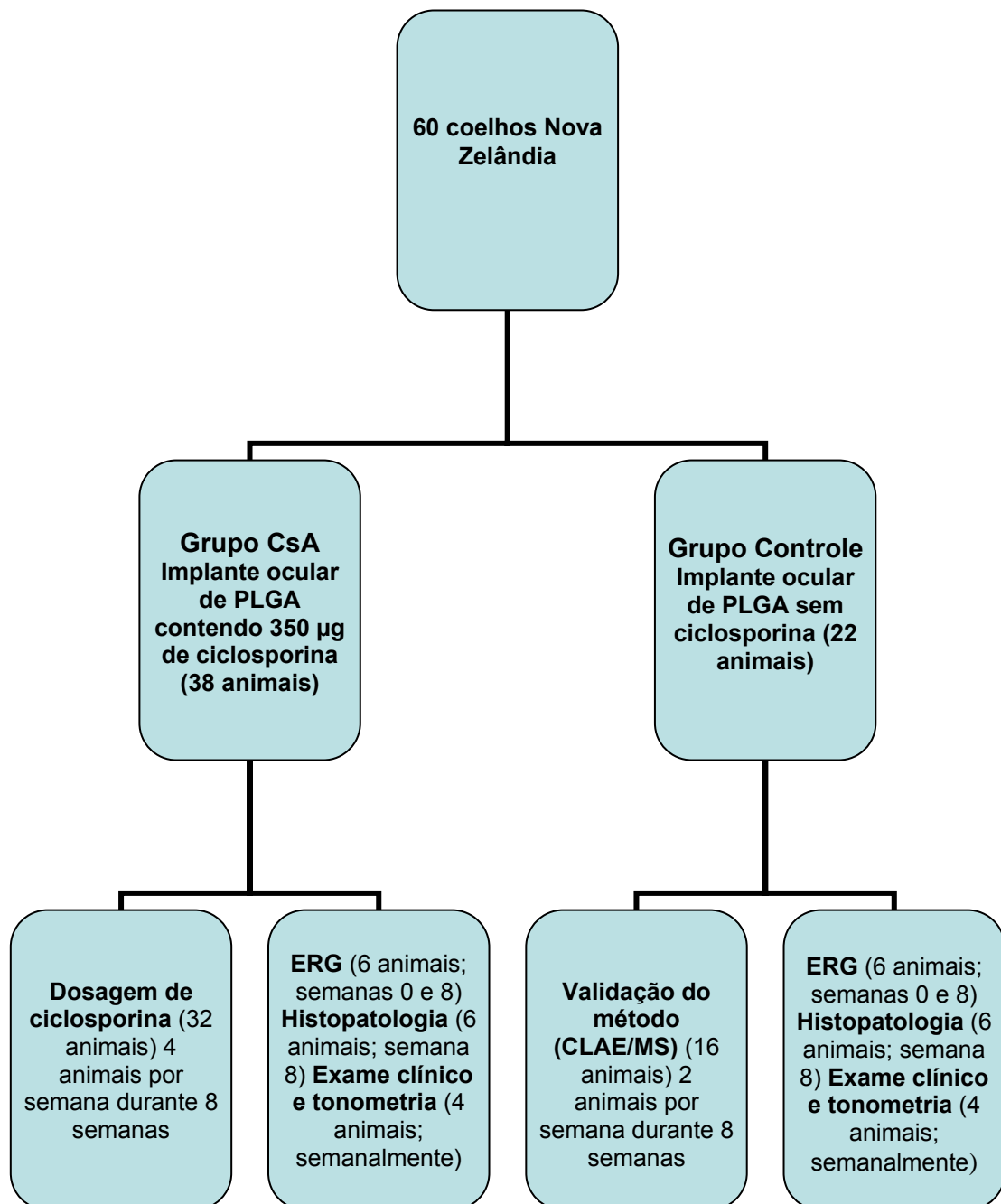
### 3.2. Animais

Sessenta coelhos fêmeas Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), pesando 1,5 Kg a 2,0 Kg, foram utilizados nesta pesquisa, de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para estudo em animais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (Anexo), estando também de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Cirurgia Experimental da FMRP-USP, cujo biotério abrigou os animais.

Os 60 animais foram divididos em dois grupos (Figura 7). O grupo CsA com 38 coelhos, que receberam o implante intraocular de PLGA contendo CsA e o grupo controle, composto por 22 animais, que receberam o implante intraocular sem CsA. Todos os animais receberam os implantes apenas no

olho direito. Quatro coelhos do grupo CsA e dois do grupo controle foram sacrificados semanalmente, durante as oito semanas de estudo, para coleta de amostras de vítreo e análise da CsA intravítrea e dos implantes em degradação. Seis animais de cada grupo foram escolhidos para serem submetidos à ERG, antes da aplicação do implante intraocular e após oito semanas, quando foram, então, sacrificados, e o olho direito enucleado e processado para estudos histológicos.

A introdução dos implantes nos olhos dos animais foi realizada sob cuidados de assepsia e acompanhamentos pós-operatórios, minimizando as complicações relacionadas ao procedimento. Todos os procedimentos, incluindo o sacrifício dos animais, foram realizados com o auxílio de um técnico do Laboratório de Cirurgia Experimental da FMRP-USP. Os coelhos ficaram confinados em gaiolas apropriadas, com temperatura ambiente média de 25°C, em sala com ar condicionado e exaustor de ar, e luminosidade variando de acordo com a luz solar. Não houve restrição de água e nem de alimentação própria para a espécie.



**Figura 7:** Desenho experimental ilustrando os dois grupos de animais estudados, com CsA e controle, e os procedimentos realizados.



### **3.3. Coleta e dosagens do material**

#### **3.3.1. Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de 30 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina (Ketalar<sup>®</sup>) e 4,0 mg/Kg de Hidrocloreto de Xilasina (Coopazine<sup>®</sup>), com doses adicionais de ketamina, se necessário, além da instilação tópica no olho direito de Cloridrato de Tetracaína 1% + Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico<sup>®</sup>, Allergan). Após assepsia do olho direito com povidine tópico (PVPI), foi realizada esclerotomia com kit de vitrectomia (Alcon<sup>®</sup> de 25 Gauge), a 2 mm do limbo corneano, onde uma cânula foi colocada para manter o pertuito na esclera temporal superior. O implante foi, então, inserido na cavidade vítrea com o auxílio de uma agulha de insulina de 29,5 Gauge. Após o procedimento cirúrgico, era instilado colírio antibiótico de Moxifloxacin (Vigamox<sup>®</sup>, Alcon).

#### **3.3.2. Obtenção do vítreo**

Os coelhos foram sacrificados sob anestesia profunda e tiveram o olho direito enucleado. Em seguida, o conteúdo vítreo foi totalmente aspirado com o auxílio de seringas de 3 ml e mantido a -80°C. O vítreo dos olhos que receberam o implante contendo CsA foram utilizados para quantificação da CsA. As amostras que continham o implante sem o fármaco foram utilizadas para validação do método de análise da CsA por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Saliba, 2011).

#### **3.3.3. Quantificação de ciclosporina no vítreo**

A dosagem da CsA intravítrea foi realizada no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. A CsA foi quantificada por CLAE, acoplada a um detector de massas (MS) (Saliba, 2011), permitindo a quantificação de concentrações na ordem de nanogramas da CsA presente no vítreo dos coelhos. A associação da CLAE ao detector MS (CLAE/MS) permitiu a quantificação da CsA em concentrações

muito baixas, limitação existente quando a CLAE é associada ao detector de ultra violeta (UV). A linearidade do método foi determinada para uma faixa de 20 a 1.000 ng/ml de CsA presente no vítreo dos coelhos (Saliba, 2011). Essa quantificação foi realizada semanalmente, durante oito semanas após a colocação dos implantes intraoculares. Para cada semana foram utilizados seis animais, sendo quatro tratados com CsA e dois controles (Figura 7). A quantidade de CsA presente no vítreo foi expressa como concentração equivalente em ng/ml de vítreo.

#### **3.3.4. Determinação da quantidade total de CsA liberada no vítreo e remanescente nos implantes retirados**

A quantidade de CsA liberada no vítreo foi determinada pela diferença entre a quantidade inicial contida no implante (353 µg) e a remanescente no implante após a sua remoção cirúrgica. A quantificação de CsA no implante foi realizada após solubilização dos implantes em acetonitrila (ACN) por CLAE/UV, desenvolvida para a quantificação da CsA em presença de produtos de degradação do PLGA 75:25, como descrito por Saliba et al. (2011).

#### **3.3.5. Avaliação da degradação da matriz polimérica do implante**

No momento da enucleação do olho, os implantes intraoculares foram retirados juntamente com o vítreo. Para a análise, os implantes foram secados e pesados em balança, com o objetivo de determinar a perda de massa polimérica.



**Figura 8:** Implante intraocular (ponta da seta) retirado após a enucleação do olho de coelho na semana 1 do estudo.

### **3.3.6. Determinação da taxa de eliminação da CsA do vítreo e do tempo de meia-vida do fármaco**

Essa avaliação foi realizada com a finalidade de melhor se compreender o perfil de eliminação e o período de permanência do fármaco na cavidade vítrea dos coelhos. A análise desses parâmetros farmacocinéticos fornece o período estimado em que ocorre a liberação completa do fármaco presente na matriz polimérica e o tempo necessário para a sua total eliminação. Dessa maneira, é possível calcular o tempo de permanência total do fármaco na cavidade vítrea após completa liberação da CsA do implante, assim como a meia-vida do fármaco no olho. Essa determinação foi realizada como descrito por Saliba (2011). Em resumo, a taxa de eliminação foi obtida pela diferença entre a quantidade de fármaco liberada e a quantidade determinada no vítreo. A farmacocinética de eliminação e determinação do tempo de meia-vida do fármaco foi calculada por meio de um gráfico relacionando a quantidade de

CsA restante no vítreo e o tempo, em dias, relativo às sete primeiras semanas de estudo (Saliba, 2011).

### **3.4. Avaliação da segurança do implante intravítreo e sua toxicidade retiniana**

#### **3.4.1. Observações clínicas**

Exames de biomicroscopia (LF) e oftalmoscopia indireta (FO) foram realizados pelo mesmo examinador em oito dos animais escolhidos para estudo de toxicidade (4 animais de cada grupo), antes e semanalmente após o procedimento cirúrgico para colocação do implante. O exame de LF foi realizado para observar eventual surgimento de hiperemia conjuntival, células e/ou *flare* na câmara anterior, congestão dos vasos da íris, hipópio e alterações da transparência do cristalino. A fundoscopia permite a observação de opacidades vítreas, descolamento de retina, dilatação dos vasos retinianos e presença de neovascularização. Para a midríase pupilar foram utilizados colírios de tropicamida 1,0% (Mydriacyl<sup>®</sup>, Alcon) e cloridrato de fenilefrina 10% (Fenilefrina<sup>®</sup>, Allergan).

Estes oito animais, quatro de cada grupo, foram submetidos à tonometria (tonômetro de Perkins) antes da aplicação do implante. O exame foi repetido semanalmente até o período final de oito semanas do experimento. Os exames foram realizados unicamente sob anestesia tópica com Cloridrato de Tetracaína 1% + Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico<sup>®</sup>, Allergan). Os valores aferidos foram corrigidos de acordo com estudo prévio (Lim et al., 2005).

#### **3.4.2. Estudo histopatológico**

A avaliação histológica foi realizada no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Haddad. Para o estudo histopatológico, foram utilizados seis olhos de coelhos do grupo controle que receberam apenas o implante, e seis do grupo com implante contendo CsA, oito semanas após a colocação do

implante. Os olhos foram enucleados, os tecidos externos removidos, e em seguida, uma calota posterior do globo ocular foi separada por meio de incisão equatorial ao nível da inserção dos músculos retos. Em seguida, o olho foi dividido em duas partes por um corte transversal horizontal ao nível do nervo óptico. As peças foram imersas em solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, durante 4 horas, a 4°C. Após lavagem em tampão durante 30 minutos, fragmentos desses segmentos, com aproximadamente 1,0 mm de espessura, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1,0% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, por duas horas, a 4°C, e, posteriormente, desidratados com uma série crescente de etanol. Os fragmentos de retina foram, então, tratados com óxido de propileno e incluídos em resina. Cortes semifinos de 0,7 µm a 0,8 µm foram obtidos com o auxílio de um micrótomo Reichert-Jung, modelo RM 2065. Após coloração com azul de toluidina, a retina e a coroide foram analisadas e fotografadas com o auxílio de um fotomicroscópio Axiophot (Carl Zeiss).

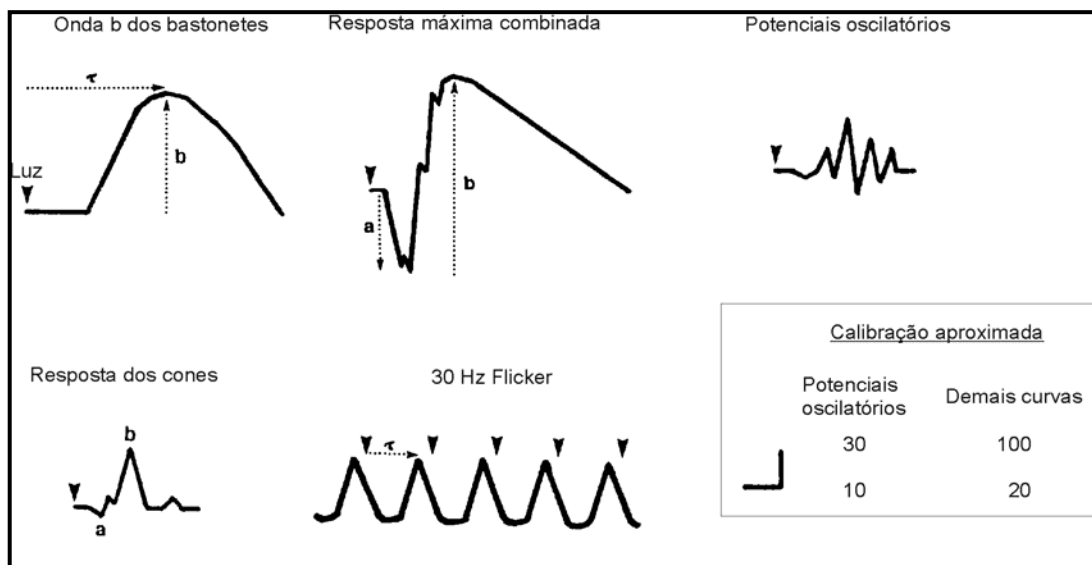
### **3.4.3. Eletrorretinografia - protocolo padrão da ISCEV (Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão)**

Com o objetivo de padronizar o registro de ERG na prática clínica, a Sociedade Internacional de Eletrofisiologia da Visão (International Society of Clinical Electrophysiology of Vision) propôs normas internacionais para realização desse exame (Marmor, Zrenner, 1998) (Figura 9). O protocolo recomenda o registro da resposta retiniana em cinco etapas, das quais três são realizadas em estado de adaptação ao escuro e duas após adaptação à luz, como descrito abaixo:

- a) Onda b dos bastonetes (rod b-wave): é registrada usando-se um *flash* curto (de 4 a 10 ms) de luminância, menor do que a do limiar dos cones (-4 a -3 log cd.s/m<sup>2</sup>), apresentado após 20 a 40 minutos de adaptação ao escuro. A resposta, em olhos saudáveis, mostra uma onda b de amplitude da ordem de 300 µV, e latência em torno

de 100 ms. É utilizada na avaliação da via dos bastonetes e suas células bipolares.

- b)** Resposta máxima combinada (maximum response): é registrada logo após a etapa anterior (onda b dos bastonetes) usando-se um *flash* curto (4 a 10 ms) de luminância, maior do que a do limiar dos cones (entre 0 a 1 log cd.s/m<sup>2</sup>), portando a resposta elétrica constitui a somatória das vias dos bastonetes e cones. Sua forma apresenta uma onda a com amplitude de 300 μV e latência de 10 a 30 ms seguida por uma onda b de amplitude da ordem de 600 μV e latências de 60 a 80 ms. Potenciais oscilatórios podem ser observados sobrepondo a fase ascendente da onda b.
- c)** Potenciais oscilatórios (oscillatory potentials): estímulo idêntico ao da resposta máxima combinada, porém filtrado entre 75 e 200 Hz para se isolar os potenciais oscilatórios. Esta resposta possui 3 a 4 picos de amplitude em torno de 40 μV, e latência de cerca de 40 ms.
- d)** Resposta dos cones (cone ERG): após adaptação à luminância suficiente para saturar a resposta elétrica dos bastonetes (34 cd/m<sup>2</sup> por 10 minutos), a resposta da via retiniana dos cones é registrada por um *flash* de luz de 4 ms de duração e 0 a 1 log cd.s/m<sup>2</sup> de luminância. Este estímulo gera uma resposta rápida, com uma pequena onda a seguida por uma onda b de amplitude em torno de 150 μV e latência de 30 ms.
- e)** 30 Hz *Flicker*: registrado após a resposta dos cones. Consiste em um estímulo de mesma luminância e duração, porém repetido com frequência de 30 Hz, produzindo resposta elétrica retiniana da mesma frequência e amplitude da ordem de 100 μV.



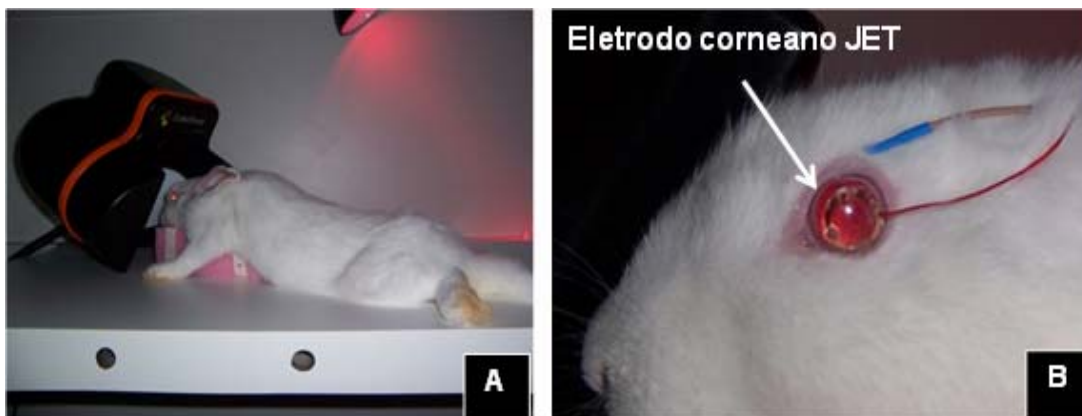
**Figura 9:** Exemplos de formas de ondas das respostas elétricas registradas no protocolo padrão internacional de eletrofisiologia da visão (ISCEV). (Modificado sob permissão de Marmor; Zrenner, 1998).

#### 3.4.4. Eletrorretinografia em olhos de coelho

Seis animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos à ERG (Colordome; Diagnosys LLC, Littleton, MA), 24 horas antes e oito semanas após a colocação do implante. O exame foi dividido em duas fases: fase 1 ou escotópica (adaptação ao escuro durante no mínimo 120 minutos) para o estudo dos bastonetes e fase 2 ou fotópica (adaptação à luz de 10 minutos) para a análise dos cones. Antes da realização da ERG, os coelhos foram sedados superficialmente com injeções intramusculares de 50 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina (Ketalar<sup>®</sup>) e 50 mg/Kg de Hidrocloreto de Xilasina (Coopazine<sup>®</sup>), além da instilação tópica de Cloridrato de Tetracaína 1% + Cloridrato de Fenilefrina 0,1% (Anestésico colírio<sup>®</sup>, Allergan).

As respostas eletrorretinográficas foram gravadas simultaneamente em ambos os olhos por meio de eletrodos corneanos Jet (Microcomponents SA) (Figura 10). Agulhas subcutâneas nas têmporas serviram como referência elétrica dos olhos; e uma terceira agulha, implantada no dorso, servia como terra do circuito. A impedância dos eletrodos foi verificada antes de cada

medida, e considerada aceitável se abaixo de  $10 \text{ k}\Omega$  a 25 Hz, conforme orientação do fabricante. Os olhos foram estimulados por meio de um Ganzfeld LED, segundo as diretrizes de uma extensão do protocolo da ISCEV. *Flashes* de luz branca (6500 K) com duração de 4 ms foram emitidos em três etapas de crescente luminância. Esses três estímulos são: **Bastonetes**:  $0,01 \text{ cd.s/m}^2$ ; **Combinada**:  $3,0 \text{ cd.s/m}^2$ ; e **Alta Luminância**:  $10 \text{ cd.s/m}^2$  com 30 segundos de intervalo entre os estímulos na fase adaptada ao escuro. Esses dois métodos permitem a avaliação da funcionalidade do sistema de bastonetes dos coelhos para poder-se excluir ou confirmar qualquer alteração funcional que eventualmente seja associada à droga, ao polímero ou ao procedimento cirúrgico. Depois de 10 minutos de adaptação à luz, com  $30 \text{ cd/m}^2$  (luz branca - 6500K), os ERGs adaptados ao claro foram realizados com *flash* de luminância de  $3 \text{ cd/m}^2$  (2 segundos de intervalo entre os estímulos) com fundo de  $30 \text{ cd/m}^2$ , chamado de **Cone**; seguido de estímulo periódico de alta frequência com o mesmo *flash* usado no Cone, mas repetido a 30Hz, chamado de **30Hz Flicker**. As respostas foram amplificadas e armazenadas para posterior análise.



**Figura 10:** Eletrorretinograma (ERG). **(A)** posicionamento do animal para o ERG, **(B)** eletrodo JET colocado na superfície ocular.



### 3.5. Análise estatística

Os resultados relativos à farmacocinética *in vivo* de CsA foram apresentados como médias e desvios padrões dos valores encontrados em cada semana. A dependência entre % CsA liberada do implante, e o tempo após implantação (semanas) foi investigada usando-se correlação linear, apresentando-se o coeficiente de Pearson ( $r$ ).

Para as relações entre as duas demais medidas: massa residual do implante, e concentração de CsA no vítreo, um modelo definido por partes foi utilizado por ser possível considerar o padrão estável inicial das distribuições dessas medidas, seguidos da variação linear com o tempo.

Nesse modelo, se o tempo em semanas ( $T$ ) for menor que o parâmetro  $t_0$ , o um valor inicial " $I$ " é atribuído. Caso contrário, ( $T$  maior ou igual a  $t_0$ ), a igualdade se torna a equação linear, com o parâmetro " $a$ " sendo a inclinação da reta, e  $t_0$  o início da variação.

Modelo:

$$\begin{array}{l} \text{if } (T < t_0) \text{ then } y = I \\ \text{else } y = I - a * (T - t_0) \end{array}$$

Para as comparações das PIO e dos parâmetros do ERG (amplitudes e latências) realizou-se análise de variância (ANOVA) com as diferenças intraindividuais de cada grupo. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

---

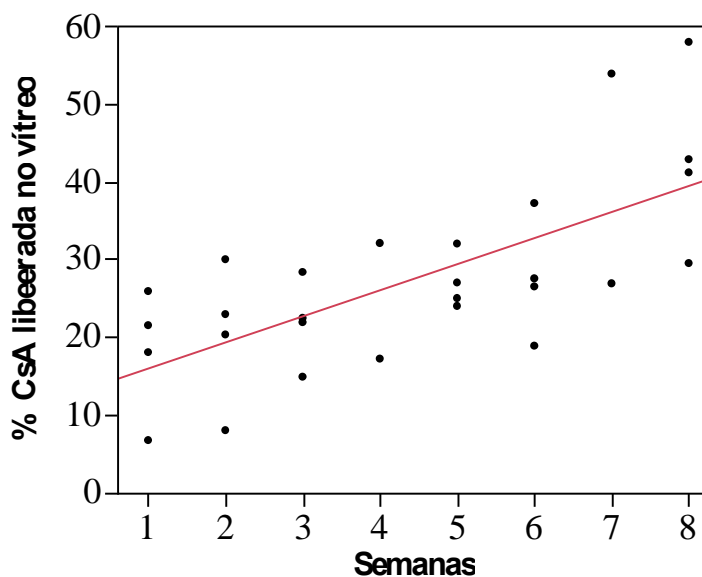
#### 4.1. Farmacocinética da CsA e degradação do implante

A quantidade de CsA liberada no vítreo, o perfil de degradação da matriz do implante e a cinética de liberação do fármaco foram determinados durante as oito semanas do estudo.

##### 4.1.1. Liberação da CsA no vítreo

O perfil de liberação da CsA no vítreo foi obtido na forma de porcentagem não acumulada de liberação do fármaco em relação ao tempo de estudo. Os valores mínimo e máximo do total de 353 µg de CsA contida no implante e que foi liberada no vítreo durante as oito semanas de experimento foram de 19,4% ± 8,2 % e 42,8% ± 11,7%, respectivamente, na primeira e última semana (Figura 11). Os valores obtidos indicam que a liberação do fármaco pelo implante aumenta continuamente com o passar do tempo. Houve aumento gradativo da liberação de CsA durante as oito semanas, sendo que durante as semanas 1 a 6, os valores médios foram de 2,4% ± 0,5, correspondendo ao total 27,5%, ou seja, na primeira semana houve liberação de 19,5% do total implantado e na sexta semana 31,2% do total da droga. Entre as semana 6 e 7 houve aumento acentuado da diferença desses valores, correspondendo a 12,8%, ou seja, passou de 31,2% para 40,5%. Na última semana, entre 7 e 8, a liberação voltou a ser semelhante à das primeiras cinco semanas, ou seja, de 2,5%, passando de 40,5% para 43,0%.

Encontrou-se correlação estatisticamente significativa entre a porcentagem de CsA liberada pelo dispositivo e o tempo após o implante, com  $r = 0,69$  ( $P < 0,0001$ ), mostrando que há aumento significativo da liberação do fármaco de  $3,3 \pm 0,7\%$  por semana, durante o período estudado (Figura 11).



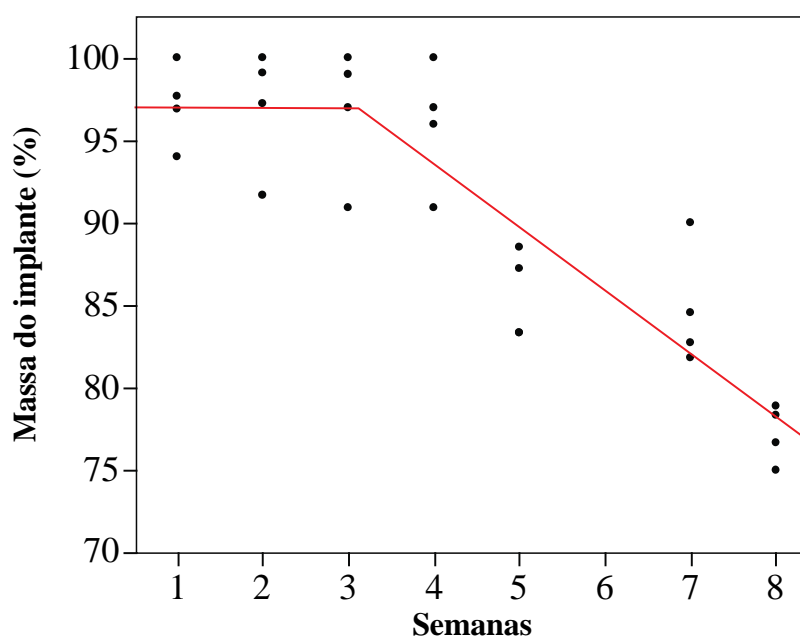
**Figura 11:** Percentagem de liberação da CsA do implante de PLGA no vítreo de coelhos durante oito semanas. Pontos indicam valores medidos, linha vermelha é a reta encontrada para a regressão linear entre a % de CsA e o tempo ( $r = 0,69$ ;  $P < 0,001$ ).

#### 4.1.2. Degradação do implante no vítreo

A perda de massa polimérica dos implantes de PLGA também foi determinada durante as oito semanas de experimento. Os implantes perderam apenas 3,1% de massa durante as primeiras quatro semanas, com progressiva degradação; perdendo, posteriormente, 9,8% entre as semanas 4 e 5; 2,7% entre as semanas 5 e 7 e 6,2% na última semana do estudo. A Figura 12 mostra um gráfico relacionando a massa do implante (em % da massa inicial) e o tempo de permanência no vítreo. Nenhum dispositivo foi degradado completamente, sendo todos recuperados após a retirada do vítreo, e mesmo após a oitava semana, observou-se perda média de  $22,8\% \pm 3,8\%$ .

Estes dados indicam que houve liberação de cerca de 25,0% de CsA pelo implante, antes do início da sua degradação. Após mostrar estabilidade até a terceira semana, observou-se correlação estatisticamente significativa entre massa residual do implante e o tempo após o implante, com  $r = -0,84$  ( $P < 0,0001$ ), mostrando que há diminuição da liberação do fármaco de  $3,8 \pm 0,7$

% por semana, a partir de  $t_0 = 3,1 \pm 0,6$  semanas, durante o período estudado (Figura 12).



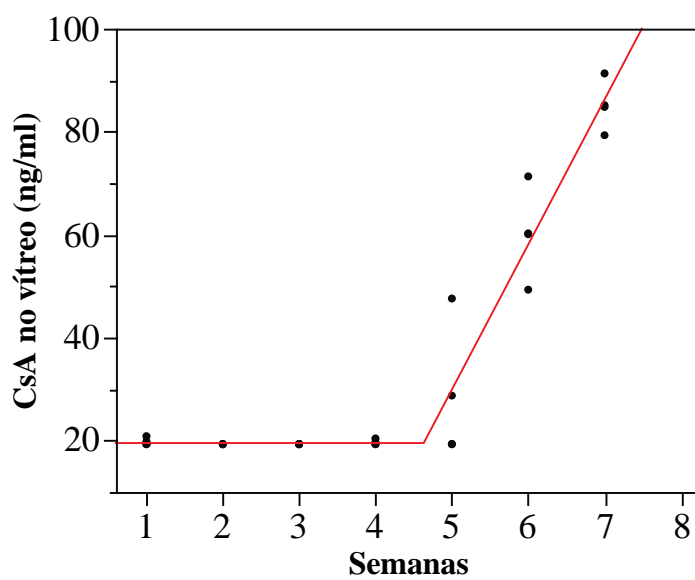
**Figura 12:** Massa do implante de PLGA em vítreo de coelho durante oito semanas. Na última semana restavam 78,2% da massa inicial do implante. Pontos indicam valores medidos, linha vermelha é a reta encontrada para a regressão linear entre a massa do implante (%) e o tempo ( $r = -0,84$ ;  $P < 0,0001$ ).

#### 4.1.3. Concentração da CsA no vítreo

As quantidades de CsA presente no vítreo, determinadas pelo método validado CLAE/MS (Saliba, 2011), durante as oito semanas de estudo, estão demonstradas na Figura 13. Nas primeiras quatro semanas, os valores foram similares, em torno de 19,3 ng/mL. Nas três aferições seguintes, os valores encontrados no vítreo aumentaram significativamente alcançando 85,13 ng/ml na semana 7. Por problemas de coleta ou de preparação da amostra, não foi possível apresentar os dados da semana 8.

Houve correlação estatisticamente significativa entre a concentração da CsA no vítreo e o tempo após o implante, com  $r = 0,93$  ( $P < 0,0001$ ), mostrando

que há aumento da quantidade de CsA no vítreo de  $28,2 \pm 3,3$  % por semana, a partir de  $t_0 = 4,6 \pm 0,1$  semanas, durante o período estudado.

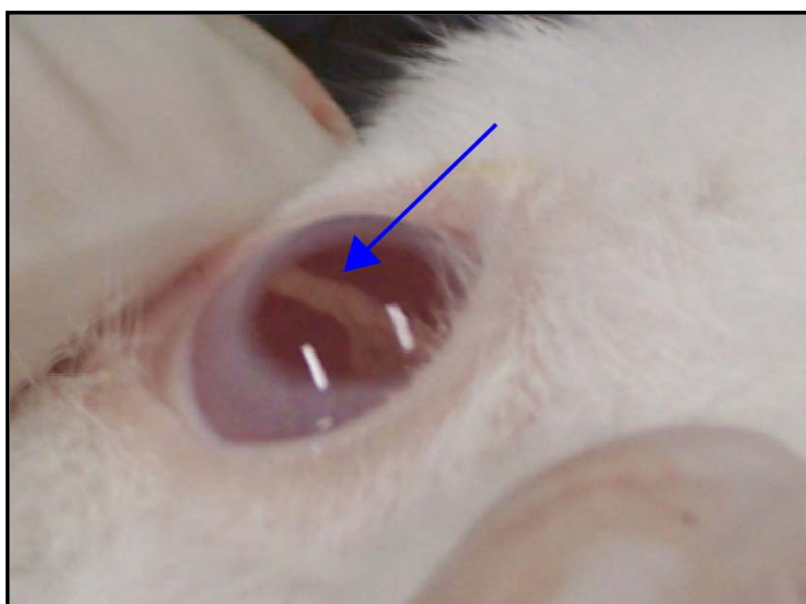


**Figura 13:** Quantidade de CsA presente no vítreo de coelhos que receberam implante de PLGA. Pontos indicam valores medidos, linha vermelha é a reta encontrada para a regressão linear entre a concentração de CsA no vítreo e o tempo ( $r = 0,93$ ;  $P < 0,0001$ ).

#### 4.2. Observação clínica e exames oftalmológicos

A inspeção ocular no período pós-operatório imediato revelou hiperemia conjuntival no local da inserção do trocarte/cânula, com resolução espontânea até o terceiro dia após o implante. No 7º dia de pós-operatório, todos os coelhos apresentavam olhos sem sinais flogísticos. Um animal do grupo CsA apresentou discreta turvação vítrea, não associada com sinais de infecção ocular, na terceira semana do estudo. Não havia congestão conjuntival, edema corneano, *flare* em segmento anterior, ou alteração da PIO. Um animal do grupo controle apresentou quadro de inflamação ocular classificada como endoftalmite e glaucoma neovascular no décimo quarto dia após o implante e

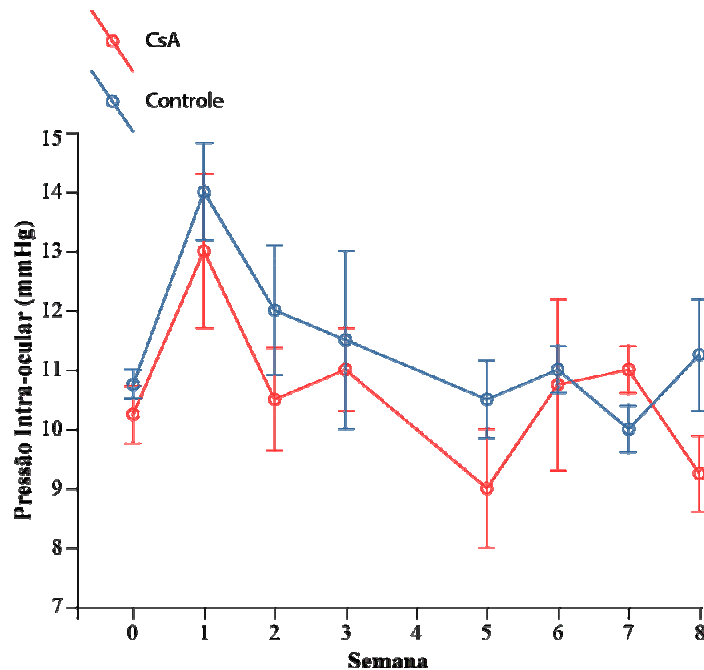
foi excluído do estudo. Nenhum coelho demonstrou opacidade do cristalino, hemorragias vítreas, descolamento de retina, dilatação dos vasos retinianos, ou neovascularização retiniana. Na maioria dos olhos, o implante permaneceu na base vítrea próximo à esclerotomia, indicando baixa mobilidade na cavidade vítrea (Figura 14).



**Figura 14:** Aspecto clínico do implante de PLGA inserido na cavidade vítrea no olho de coelho duas semanas após o procedimento cirúrgico.

Na 1<sup>a</sup> semana após colocação do implante, as medidas da PIO mostraram discreto aumento da pressão média (aproximadamente 2 mmHg) dentro de cada grupo, nos dois grupos ( $P < 0,05$ ), mas não houve diferença estatística entre os grupos nessa semana (ANOVA,  $F = 0,14$ ;  $P = 0,7216$ ). Não houve diferenças significativas intra-individual ou entre grupos em nenhum outro período do estudo ( $P > 0,05$ ).

A Figura 15 mostra as variações da PIO durante o período estudado.



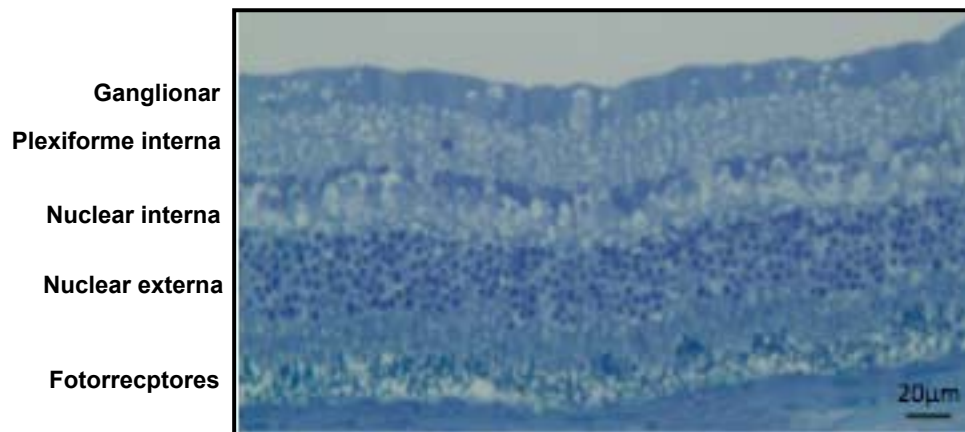
**Figura 15:** Variação da pressão intraocular em olhos de coelhos que receberam implantes de PLGA com e sem CsA durante oito semanas.

### 4.3. Histologia da retina

As retinas de todos os animais controle e com CsA apresentaram aspectos microscópicos normais em todos os olhos avaliados histologicamente para os dois grupos, após as oito semanas de estudo. A retina mostrava o epitélio pigmentar, seguido de camadas dos fotorreceptores, nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, ganglionar e de fibras nervosas (Figuras 16a e 16b).

Não foram observados sinais de necrose, perda de fotorreceptores, restos celulares, degeneração cística, infiltrados inflamatórios ou hipocelularidade das camadas nucleares. O corpo dos fotorreceptores encontrava-se intacto, sem sinais de picnose. Também não foram encontradas alterações na camada de células ganglionares e no epitélio pigmentado para nenhuma das camadas avaliadas (Figuras 16a e 16b).





**Figura 16a:** Corte histopatológico da retina de coelho do grupo controle corado com azul de toluidina (aumento 240 x).



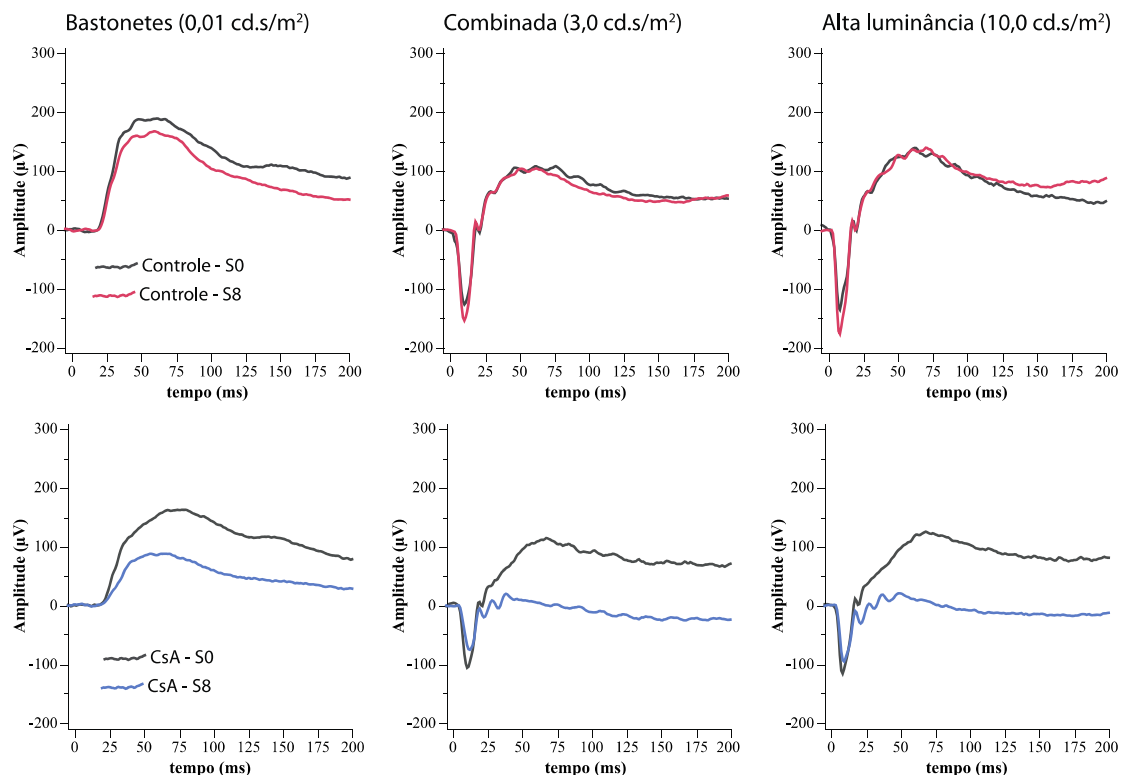
**Figura 16b:** Corte histopatológico da retina de coelho do grupo CsA corado com azul de toluidina (aumento 240 x) mostrando ausência de sinais inflamatórios ou hipocelularidade nas camadas nucleares.

#### **4.4. Eletrorretinografia**

As ERGs foram realizadas com sucesso em todos animais examinados, mas somente quando o posicionamento dos eletrodos indicava impedância menor ou igual a 10 M $\Omega$  (megohm) em ambos os olhos; e em todos os testes, o examinador certificava se a relação sinal ruído era adequada (ruídos aleatórios com amplitude menor que 20  $\mu$ V). Respostas com artefatos por eventual movimentação do animal ou dos olhos foram filtradas e excluídas das médias finais para cada estímulo. Não ocorreram efeitos adversos após a realização dos exames, com animais recuperando-se da anestesia no tempo previsto e sem alterações oculares.

##### **4.4.1. ERG adaptado ao escuro**

Por convenção, a ERG foi sempre realizada bilateralmente. Os exames dos olhos esquerdos dos coelhos foram utilizados como parâmetros de normalidade. Não houve diferenças estatísticas entre os olhos esquerdo e direito antes ou após o implante no grupo controle, e também não ocorreram alterações detectáveis no olho esquerdo após implante no grupo CsA no olho direito. A Figura 17 mostra exemplos de respostas dos três estímulos nos dois grupos antes e após o implante. Estes exemplos ilustram a ausência de efeitos do implante sem a CsA nas respostas eletrorretinográficas, com curvas extremamente semelhantes em forma, amplitude e latência oito semanas após o procedimento. Por outro lado, houve diminuição exclusiva da onda b nos animais que receberam CsA no vítreo.



**Figura 17:** ERG de olhos de coelhos com implante de PLGA com e sem CsA aplicada no vítreo após adaptação ao escuro. Nos gráficos inferiores, observa-se que no grupo tratado com CsA houve diminuição da amplitude da onda b no exame da semana 8 nas luminâncias de 0,01, 3,0 e 10,0 cd.s/m<sup>2</sup>.

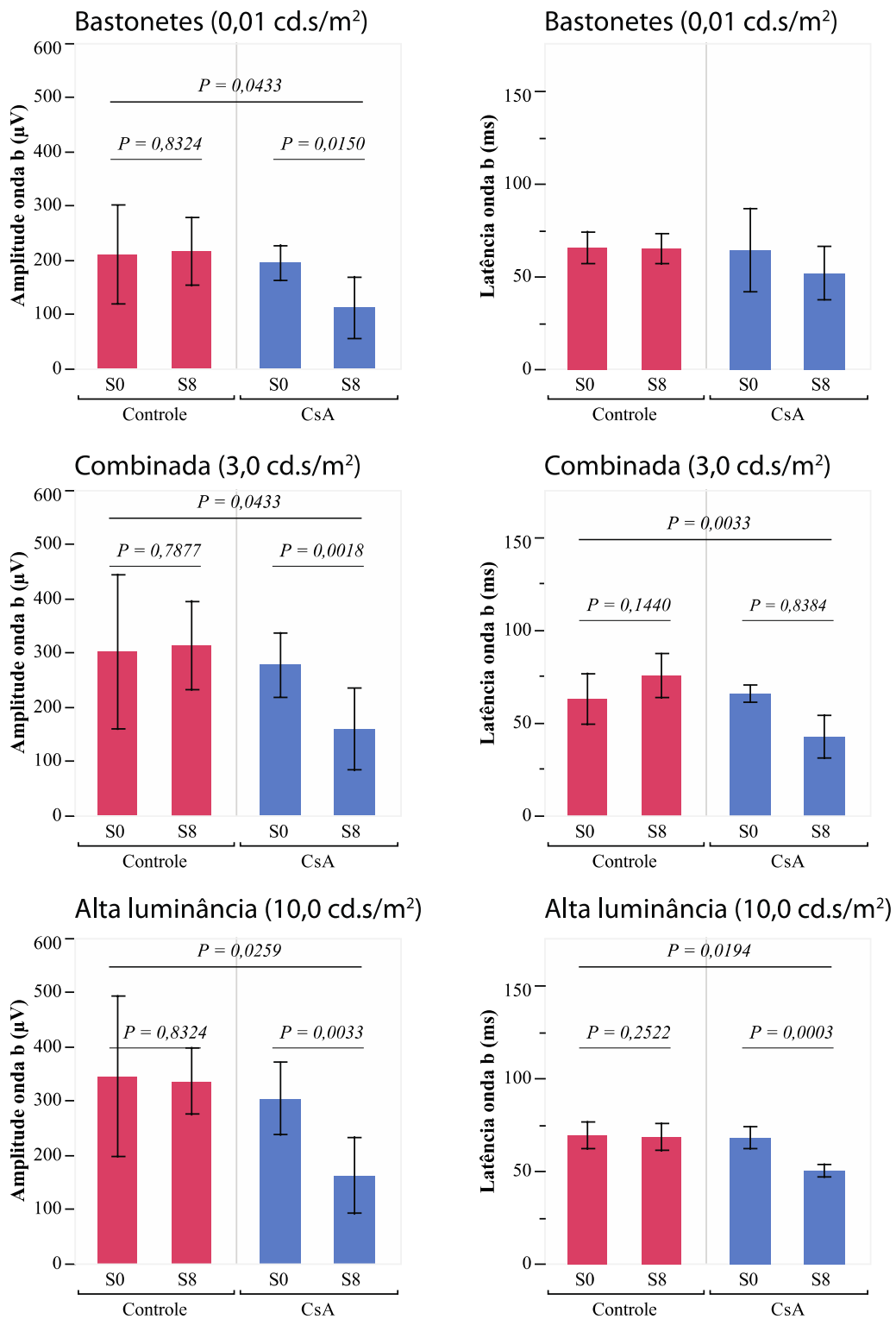
Não houve diferenças estatísticas entre as medidas das respostas do ERG (amplitudes ou latências de todos os estímulos) entre os grupos CsA e controle na avaliação inicial (Tabela 1 e Figuras 18 e 19).

**Tabela 1:** Média  $\pm$  erro padrão do ERG escotópico no exame inicial (S0) e na semana 8 (S8) de seguimento nos animais dos grupos controle e com CsA.

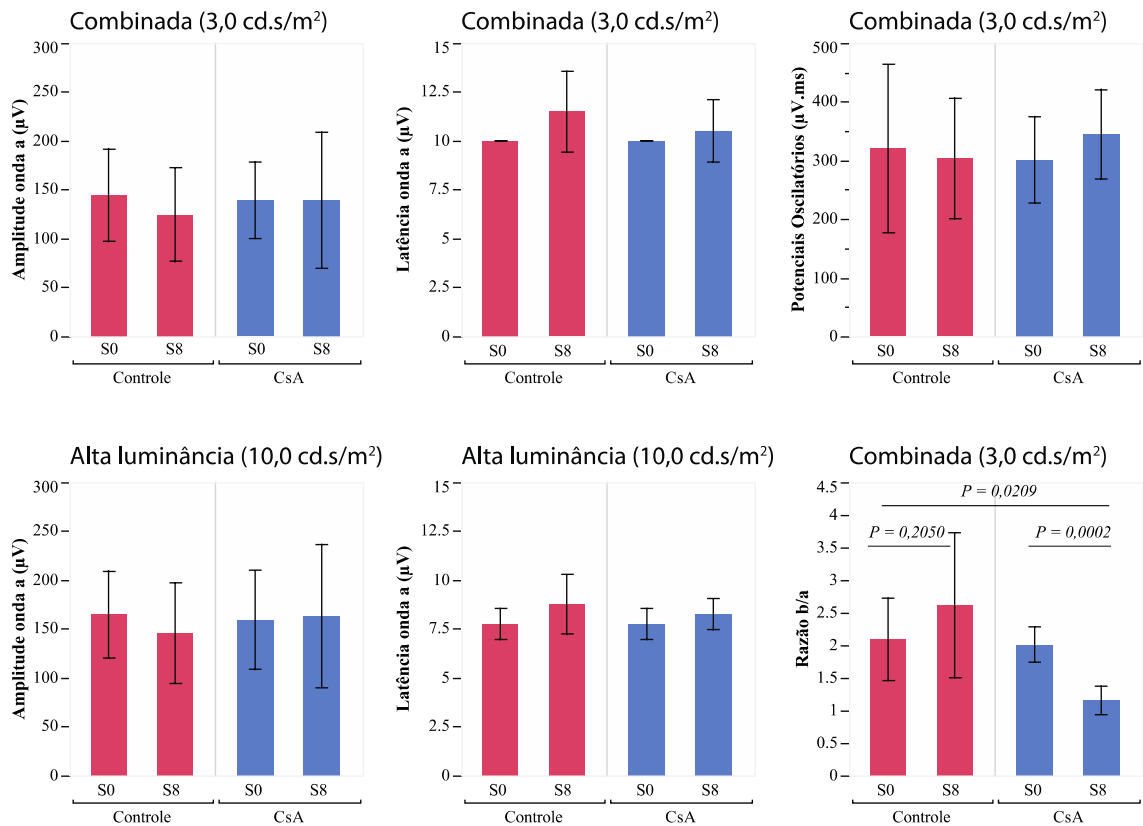
		Controle		CsA	
		S0	S8	S0	S8
Bastonetes (0,01 cd.s/m <sup>2</sup> )	Amplitude onda b ( $\mu$ V)	209,8 $\pm$ 28,6	215,0 $\pm$ 19,7	194,6 $\pm$ 10,3	112,6 $\pm$ 17,7
	Latência onda b (ms)	65,8 $\pm$ 2,7	65 $\pm$ 2,5	64,3 $\pm$ 7,1	51,8 $\pm$ 4,4
Combinada (3,0 cd.s/m <sup>2</sup> )	Amplitude onda a ( $\mu$ V)	144,3 $\pm$ 15	124,4 $\pm$ 15,1	139,0 $\pm$ 12,2	139,2 $\pm$ 21,8
	Latência onda a (ms)	10,0 $\pm$ 0,0	11,5 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,0	10,5 $\pm$ 0,5
	Razão b/a	2,1 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1
	Amplitude onda b ( $\mu$ V)	301,2 $\pm$ 44,7	313,6 $\pm$ 25,8	277,1 $\pm$ 18,6	158,7 $\pm$ 23,7
	Latência onda b (ms)	63,0 $\pm$ 4,3	75,5 $\pm$ 3,7	65,8 $\pm$ 1,4	43,5 $\pm$ 3,2
	Potenciais Oscilatórios ( $\mu$ V.ms)	320,0 $\pm$ 44,9	303,2 $\pm$ 32,4	301,1 $\pm$ 23,1	344,6 $\pm$ 24,0
Alta intensidade (10,0 cd.s/m <sup>2</sup> )	Amplitude onda a ( $\mu$ V)	164,9 $\pm$ 14,0	146,0 $\pm$ 16,1	159,0 $\pm$ 15,9	163,4 $\pm$ 22,9
	Latência onda a (ms)	7,8 $\pm$ 0,3	8,8 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,3
	Amplitude onda b ( $\mu$ V)	345,1 $\pm$ 46,5	335,8 $\pm$ 19,4	303,4 $\pm$ 21,0	162,1 $\pm$ 22,2
	Latência onda b (ms)	69,3 $\pm$ 2,3	68,3 $\pm$ 2,3	68,0 $\pm$ 1,9	50,3 $\pm$ 1,1

S0: semana 0; S8: semana 8.

Como esperado pelas alterações observadas nos exemplos mostrados, o grupo CsA mostrou diminuição estatisticamente significativa intra e entre os grupos da amplitude da onda b dos três estímulos, da latência da onda b no estímulo de alta intensidade e da razão b/a para o estímulo 3,0 cd.s/m<sup>2</sup> (Tabela 1 e Figuras 18 e 19). Deve-se ressaltar que, mesmo no período em que a redução da onda b do ERG foi medida, histologicamente a retina estava normal, com sua morfologia preservada em todas as camadas (Figura 16a e 16b).



**Figura 18:** Colunas representam a média da amplitude e latência da onda b nas três intensidades de luminância de 0,01, 3,0 e 10,0 cd.s/m<sup>2</sup>. Barras de erro são o intervalo de confiança de 95% da média. Valores estatisticamente diferentes intra e entre os grupos estão assinalados na figura.



**Figura 19:** Colunas representam a média da amplitude e latência da onda a nas intensidades de luminância de 3 e 10  $\text{cd.s/m}^2$ . Barras de erro são o intervalo de confiança de 95% da média. Valores estatisticamente diferentes intra e entre os grupos estão assinalados na figura.

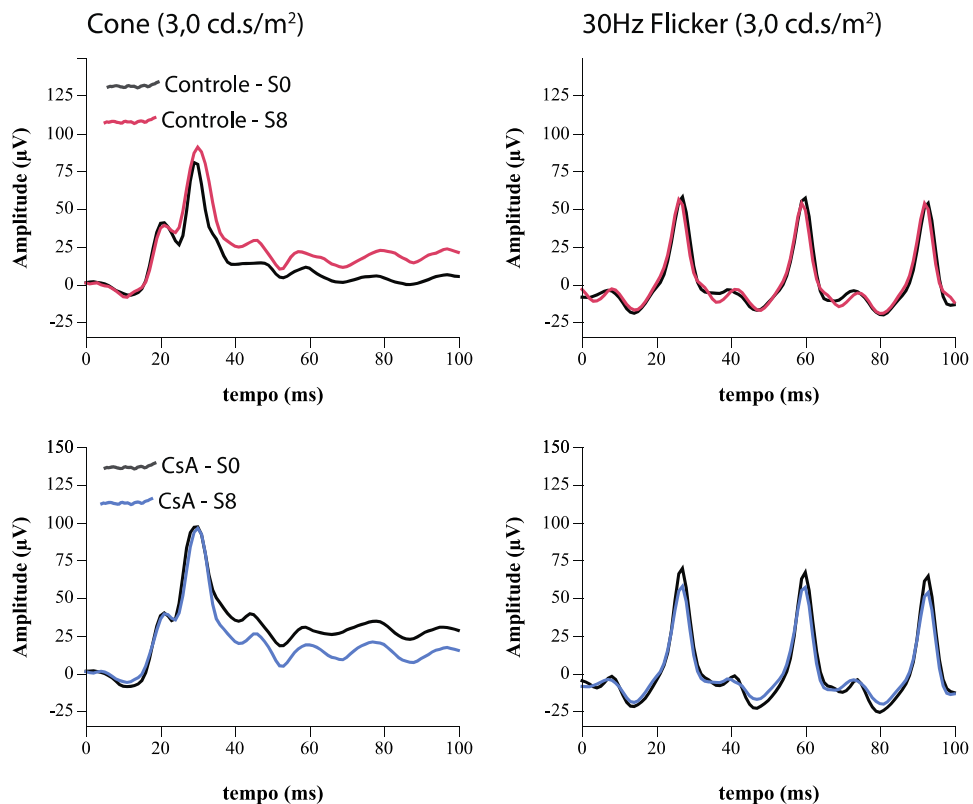
#### 4.4.2. ERG adaptado ao claro

A análise dos dados colhidos durante a fase fotópica do ERG mostrou que não houve diferenças estatísticas entre as medidas das respostas do ERG, tanto das amplitudes da onda b quanto dos períodos de latências aos estímulos de 3,0  $\text{cd.s/m}^2$  com fundo de 30  $\text{cd/m}^2$  (fase Cone) e o 30 Hz *Flicker*, quando comparados os exames dos grupos CsA e controle na semana inicial e na semana 8 (Tabela 2 e Figuras 20 e 21).

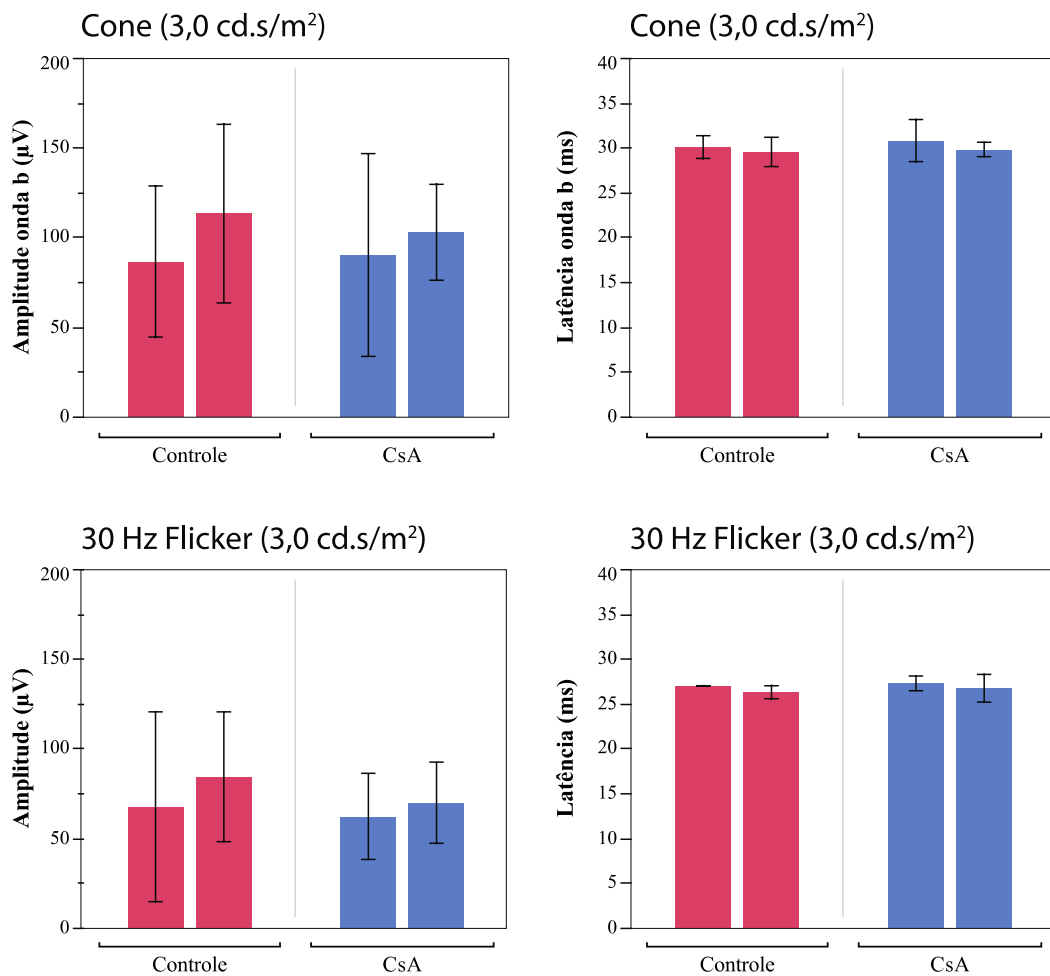
**Tabela 2:** Média  $\pm$  erro padrão das respostas do ERG aos estímulos de  $3,0 \text{ cd.s/m}^2$  com fundo de  $30 \text{ cd/m}^2$  (fase Cone) e o  $30 \text{ Hz Flicker}$  no exame inicial (S0) e na semana 8 (S8) de seguimento.

		Controle		CsA	
		S0	S8	S0	S8
Cone	Amplitude onda b ( $\mu\text{V}$ )	$86,2 \pm 13,3$	$113,4 \pm 15,7$	$90,2 \pm 17,7$	$102,8 \pm 8,5$
	Latência onda b (ms)	$30,0 \pm 0,4$	$29,5 \pm 0,5$	$30,8 \pm 0,8$	$29,8 \pm 0,3$
30 Hz Flicker	Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	$67,3 \pm 12,3$	$84,1 \pm 11,4$	$61,9 \pm 7,5$	$69,4 \pm 7,1$
	Latência (ms)	$27,0 \pm 0,1$	$26,3 \pm 0,3$	$27,3 \pm 0,3$	$26,8 \pm 0,5$

S0: semana 0; S8: semana 8.



**Figura 20:** Exemplos de respostas obtidas no ERG após adaptação à claridade, mostrando ausência de alterações da amplitude da onda b e dos períodos de latência nos grupos controle e CsA nas semanas 0 e 8.



**Figura 21:** Resposta da onda b (amplitude e latência) na fase “Cone” (3,0 cd.s/m<sup>2</sup> com fundo de 30 cd/m<sup>2</sup>) e resposta ao estímulo 30Hz *Flicker*, mostrando ausência de qualquer diferença estatisticamente significativa, tanto entre como intra grupo.



## 5. DISCUSSÃO

---

O tratamento farmacológico ideal deve promover resolução da morbidade, apresentando baixa toxicidade e posologia confortável. Nenhuma estratégia terapêutica utilizada na prática oftalmológica com injeções intraoculares ou implantes intravítreos de liberação lenta de fármacos atinge esses objetivos (Geroski, Edelhauser, 2000, Lim et al., 1999).

Sistemas intraoculares de liberação de drogas, em especial os constituídos por biomateriais, têm alto potencial de melhorar a qualidade das estratégias terapêuticas, e conseqüentemente, a qualidade de vida de pacientes na oftalmologia, principalmente daqueles que sofrem de doenças que acometem o segmento posterior do olho, pois os tratamentos nesses casos implicam em múltiplas injeções intravítreas, que além do desconforto inerente ao procedimento, não são isentas de complicações. Todavia, a biocompatibilidade desses sistemas tem que ser melhorada (Choonara et al., 2010). No presente estudo foram avaliados a toxicidade e o perfil de liberação de 350 µg de CsA contida em implante biodegradável de PLGA 75:25 com 31,6% de CsA e 68,4% de PLGA na cavidade vítrea de coelhos no período de oito semanas, com o objetivo de desenvolver novo sistema de liberação lenta dessa medicação no vítreo.

### **Farmacocinética da CsA**

A curva de liberação do fármaco apresentou padrão semelhante ao observado anteriormente com matrizes poliméricas biodegradáveis a base de polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico (Yasukawa et al., 2001). Observou-se aumento abrupto (“burst”) inicial durante a primeira semana de estudo, fase na qual houve rápida liberação da CsA da superfície do implante, correspondente a cerca de 20% do fármaco. A partir desse momento, como a matriz do implante era compacta, a taxa de liberação do fármaco tornou-se mais lenta até a semana 6 do estudo, com liberação média de 2,37% por semana (Saliba et al., 2008). Em seguida, o contato do vítreo com a superfície da matriz desencadeou o intumescimento inicial da mesma, provocando pequenas hidrólises poliméricas com formação de poros na sua superfície,

facilitando a difusão da CsA. Esta sequência de eventos explica o aumento da taxa de liberação de CsA entre as semanas 6 e 7, quando 12,83% da droga contida no implante foi liberada. Em seguida, nas semanas 7 e 8, a liberação voltou a ser mais lenta (2,48%), pois, provavelmente, o vítreo já liquefeito penetrou na matriz com mais facilidade, permitindo lento aumento da taxa de liberação, como mostrado na Figura 11. O processo de difusão por meio da matriz porosa foi, possivelmente, o mecanismo primordial para a liberação do fármaco durante o período estudado.

De fato, a partir das 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas deste estudo, a quantidade de CsA intravítrea aumentou, assim como a perda de massa polimérica do implante, quando detectou-se significativa liberação de fármaco da matriz polimérica. A permanência de pequena quantidade (nanogramas) de CsA no vítreo durante as sete semanas avaliadas indica que a maior parte do fármaco liberado do implante foi eliminada. A quantidade de CsA liberada pelo implante foi muito semelhante à quantidade de eliminação da droga, estimando-se que tenha sido de 99,9%, não havendo saturação de CsA no vítreo (Saliba et al., 2011). Dessa forma, a meia-vida da droga foi estável durante o período estudado, já que não houve grandes aumentos da concentração da droga.

O tempo planejado para o experimento foi insuficiente para determinar todas as etapas de liberação da CsA e apenas 42,8% do total de CsA contida no implante foram liberados durante as oito semanas de estudo. A fase terciária, etapa que pode liberar altas doses do fármaco, caracterizada pela desintegração da matriz, não foi observada, visto que houve perda de apenas 22,8% da massa do implante durante todo o período estudado (Yasukawa et al., 2001). Estudos mais longos devem ser realizados a fim de se verificar o comportamento do implante nas fases mais tardias.

Dong et al. (2006) usaram implante biodegradável semelhante contendo CsA em modelo experimental de uveíte crônica em coelhos por um período de 14 semanas. Os autores relatam que atingiram doses intravítreas de 450 a 600 ng/ml e obtiveram controle do processo inflamatório no grupo tratado. Nesse estudo, o ERG foi utilizado para avaliar os efeitos da deterioração da função

retiniana decorrente do processo inflamatório, e menor perda de amplitude da onda b do ERG foi descrita, em virtude da melhora da uveíte nesses animais tratados com CsA. O trabalho citado não fornece detalhes acerca dos resultados eletrorretinográficos, mas a discrepância com os achados do presente estudo é evidente, visto que o componente do ERG mais acometido pela toxicidade da CsA, observada neste estudo, com dose significativamente menor, é a amplitude da onda b. Possivelmente, a presença da uveíte e/ou diferenças do período de exposição da retina a CsA e a reversibilidade da sua toxicidade podem ser as causas das diferenças entre os dois estudos (Pearson et al., 1996, Dong et al., 2006).

De acordo com Lafferty et al. (1983), os linfócitos T têm a liberação de linfocinas inibida quando o nível de CsA está entre 10-100 ng/ml, enquanto a ativação dessas células é bloqueada quando os níveis da CsA estão entre 100-1000 ng/ml. Gilger et al. (2000) utilizaram dispositivo discoide não-biodegradável de PVA contendo 0,5 mg de CsA para tratamento bem sucedido de uveíte autoimune induzida em cavalos, e relataram taxa de liberação de 2 µg/dia e concentração média dos níveis de CsA intravítrea de  $52 \pm 15$  ng/ml. A duração e severidade da inflamação, do infiltrado celular, da destruição tecidual e dos níveis de citocinas inflamatórias foram significativamente menores nos olhos que receberam os implantes com CsA. Em tempo, os autores não detectaram CsA no sangue periférico dos animais.

Com o implante utilizado no presente estudo alcançou-se concentração de 84,13 ng/ml na última dosagem de CsA intravítrea (7<sup>a</sup> semana), que estaria, portanto, dentro dos limites terapêuticos estimados para o controle de uveítes (Lafferty et al, 1983). A taxa de eliminação estimada da CsA foi de aproximadamente 3,0 µg/dia, e a meia-vida de 69,3 dias. Dessa forma, seriam necessárias 17 semanas para a completa eliminação dos 350 µg de CsA presentes nos implantes (Saliba, 2011); um período longo o suficiente para aliviar a necessidade de retratamento, muitas vezes mensal, de muitas estratégias terapêuticas.

### **Toxicidade ocular**

Estudos prévios mostraram opacidade transitória e focal do cristalino com o uso de polímeros intraoculares contendo CsA em coelhos, com retorno à sua transparência fisiológica após a retirada do implante. A opacidade do cristalino não teve sua causa esclarecida, mas os autores acreditam ter sido causada por depósito direto da droga (Pearson et al., 1996). No presente estudo não foi detectada qualquer alteração ocular durante as oito semanas de acompanhamento, provavelmente pela menor concentração da CsA utilizada.

Observou-se discreto aumento da PIO em ambos os grupos nas aferições da semana 1 (aproximadamente 2 mmHg), sem diferença entre os grupos. Nas semanas subsequentes, as medidas tonométricas foram semelhantes à encontrada na avaliação inicial. A análise estatística não mostrou diferença significativa intraindividual em nenhum dos grupos. Entretanto, em outro estudo no qual os implantes foram colocados via esclerotomia de 19 Gauge sem o uso de trocartes, foi notada tendência à queda nos valores tonométricos de 2 a 3 mmHg na primeira semana após o procedimento. A diminuição da PIO foi atribuída à perda vítrea ocorrida no momento da esclerotomia (Rêgo, 2005). Nesse estudo, a colocação do implante pode justificar o aumento da PIO nos exames da semana 1, já que as perdas vítreas foram muito discretas devido à utilização do sistema de 25 Gauge para a realização do procedimento. Além disso, o sistema de menor calibre permite que a cirurgia seja mais rápida, pois dispensa sutura.

Para a comparação de medidas de PIO em diferentes estudos com coelhos, vale lembrar que a ketamina intramuscular pode provocar aumento de 7% dessa PIO (Antal et al., 1978), mas essa variação não foi levada em consideração no presente estudo, já que todas as aferições foram realizadas unicamente sob anestesia local, sem qualquer interferência do agente anestésico.

### **Histologia da retina**

Histologicamente, não foram notadas alterações no tecido retiniano dos coelhos em ambos os grupos estudados. Deve-se ressaltar que cortes semifinos de 0,7-0,8  $\mu\text{m}$  de espessura de material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em ósmio, forneceram amostras de excelente qualidade, permitindo avaliação microscópica detalhada e confiável. A princípio, com a histologia normal, é pouco provável que as espessuras das camadas da retina estejam alteradas. De qualquer maneira, medidas quantitativas para a comparação entre os grupos não foram realizadas, já que a inclusão do presente material não permitiu cortes com as posições ideais para a mensuração confiável da retina. Após análise qualitativa de ambos os grupos, as retinas foram consideradas histologicamente normais.

### **Eletrorretinograma**

A diminuição da onda b provocada pela CsA já foi previamente descrita e é reversível (Pearson et al., 1996). Em estudo anterior, implantes intraoculares de CsA associados com dexametasona (Enyedi et al., 1996) provocaram depressão na onda b durante as fases fotópicas e escotópicas, quando as concentrações vítreas da CsA eram de aproximadamente 60 ng/ml, e ambas também foram reversíveis depois que menor quantidade da droga passou a ser liberada pelo implante intraocular. Neste estudo, as anormalidades observadas na onda b foram atribuídas apenas à CsA, já que implantes contendo apenas dexametasona (na mesma quantidade compreendida no implante de CsA/dexametasona) foram testados e não apresentaram qualquer alteração no ERG.

Pearson et al. (1996) observaram alterações eletrorretinográficas transitórias que desapareceram após 16 semanas da retirada do implante do olho, quando a concentração de CsA foi reduzida. Foi observada, ainda, diminuição da amplitude da onda b fotópica e escotópica com 500 ng/ml de concentração intravítrea de CsA, liberadas por polímeros intraoculares em coelhos, que retornaram ao padrão normal após a remoção do implante. O

mesmo implante que causou toxicidade retiniana em coelhos foi testado em macacos e não provocou qualquer toxicidade retiniana. Segundo os autores, esses dados sugerem que o implante seja não-tóxico em humanos, já que nossa anatomia retiniana é bastante semelhante à dos primatas apresentando vasculatura retiniana mais complexa, impedindo o acúmulo de CsA em níveis tóxicos intrarretinianos, devendo-se também considerar que o volume vítreo é maior nos macacos se comparados aos coelhos (Pearson et al., 1996).

Os resultados do presente estudo mostraram que os dados colhidos durante a fase fotópica do ERG não apresentaram diferenças estatísticas, tanto das amplitudes da onda b quanto das latências para os estímulos Cone e 30 Hz *Flicker*.

O padrão de resposta eletrorretinográfica com diminuição exclusiva da onda b é denominado “ERG negativo”, e é encontrado em patologias com alterações específicas de estruturas retinianas, que geram esse potencial positivo, sem mudanças na geração da onda a. Exemplos desta alteração são encontrados em: cegueira noturna estacionária congênita (sigla do inglês: CSNB) ou retinosquise juvenil ligada ao X, ou doenças com isquemia severa da retina, como na fase aguda da oclusão da artéria central da retina ou retinopatia diabética avançada, sugerindo efeitos tóxicos nas células de Müller e bipolares. Como a onda b é gerada, principalmente pela despolarização das células bipolares ON dos bastonetes, pode-se inferir que a anormalidade observada deve ter alguma ligação com alterações funcionais dessas células (Pearson et al., 1996).

Vale ressaltar que as alterações nas latências da onda b encontradas podem ser atribuídas à ausência do pico em que normalmente é determinada a onda b. Com o achatamento dessa curva, tem-se um aumento da variabilidade da medida, e um valor de latência menor é geralmente encontrado para o valor máximo da resposta devido à presença dos potenciais oscilatórios que seguem a onda a.

Foram utilizados neste estudo animais sadios e com olhos normais, para que qualquer efeito adverso pudesse ser atribuído ao implante de PLGA e/ou à

---

droga injetados na cavidade vítrea. Estudos prévios mostraram que durante o episódio de inflamação aguda há a quebra da barreira hematorretiniana e passagem de componentes plasmáticos para o olho. Assim, o implante teria maior taxa de liberação da droga durante a fase inflamatória, seguida de menor liberação proporcional ao controle da atividade da doença, ou seja, com a restauração da barreira hematorretiniana, a taxa de liberação da droga pelo implante diminui (Cheng et al., 1995). Esta é mais uma vantagem dos sistemas de atividade prolongada, já que a droga passa a ser liberada de acordo com a gravidade da doença ocular. Os efeitos adversos, como a toxicidade apresentada no ERG, devem ser complementados com novas investigações, principalmente com relação ao tempo de seguimento do estudo.

Quanto à biocompatibilidade e toxicidade, não ocorreu nenhuma alteração nos olhos dos animais que receberam os implantes, mas leve grau de comprometimento na função retiniana foi detectado. No entanto, esse sinal de toxicidade deve ser revertido alguns dias após a total eliminação do fármaco. Se faz necessário testar os mesmos implantes com concentrações inferiores de CsA a fim de se determinar a concentração segura e clinicamente efetiva deste medicamento nos implantes intraoculares.



## 6. CONCLUSÕES

---

Após análise dos resultados, concluiu-se que:

- O implante de CsA estudado liberou, *in vivo*, quantidades crescentes de CsA no vítreo dos coelhos durante oito semanas. Na primeira semana, 20% da droga já haviam sido liberados atingindo 45% na oitava semana.
- A colocação do implante e a presença do mesmo no vítreo não causaram alterações significativas na PIO nos olhos dos coelhos.
- A presença do sistema de liberação de PLGA sem CsA no vítreo dos coelhos não causou toxicidade retiniana funcional (ERG) ou estrutural (histologia). Todavia, o implante com CsA causou diminuição exclusiva da onda b do ERG após adaptação ao escuro (ERG negativo), sem causar alterações morfológicas no período de oito semanas, sugerindo toxicidade específica na conexão entre bastonetes e suas células bipolares ON.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

Alghadyan AA, Peyman GA, Khoobehi B, Liu KR. Liposome-bound cyclosporine: retinal toxicity after intravitreal injection. *Int Ophthalmol*. 1988;12:105-7.

Algros MP, Angonin R, Delbosc B, Cahn JY, Kantelip B. Danger of systemic cyclosporine for corneal graft. *Cornea*. 2002;21:613-4.

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*. 2000a;41:1181-5.

Ambati J, Gragoudas ES, Miller JW, You TT, Miyamoto K, Delori FC, Adamis AP. Transscleral delivery of bioactive protein to the choroid and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000b;41:1186-91.

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

Apel A, Oh C, Chiu R, Saville B, Cheng YL, Rootman D. A subconjunctival degradable implant for cyclosporine delivery in corneal transplant therapy. *Curr Eye Res*. 1995;14:659-67.

Ashton P, Brown JD, Pearson PA, Blandford DL, Smith TJ, Anand R, Nightingale SD, Sanborn GE. Intravitreal ganciclovir pharmacokinetics in rabbits and man. *J Ocul Pharmacol*. 1992;8:343-7.

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

Axelrod L. Glucocorticoid therapy. *Medicine (Baltimore)*. 1976;55:39-65.

Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*. 1987;32:19-25.

BenEzra D, and Maftzir G. Ocular penetration of cyclosporin A. The rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:1362-6.

Bourges JL, Bloquel C, Thomas A, Froussart F, Bochot A, Azan F, Gurny R, BenEzra D, Behar-Cohen F. Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:1182-202.

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.

Choonara YE, Pillay V, Danckwerts MP, Carmichael TR, du Toit LC. A review of implantable intravitreal drug delivery technologies for the treatment of posterior segment eye diseases. *J Pharm Sci.* 2010;99:2219-39.

Cipriani R, Farias ML. Osteoporosis after solid organs transplantation. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49:369-77.

de Rojas Silva MV, Rodriguez-Ares MT, Sanchez-Salorio M, Lamas Diaz MJ, Cuevas Alvarez J, Vila Jato JL, Capeans Tome C. Efficacy of subconjunctival cyclosporin-containing microspheres on keratoplasty rejection in the rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999;237:840-7.

Dong X, Shi W, Yuan G, Xie L, Wang S, Lin P. Intravitreal implantation of the biodegradable cyclosporin A drug delivery system for experimental chronic uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244:492-7.

Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol.* 2009;54:321-38.

Enyedi LB, Pearson PA, Ashton P, Jaffe GJ. An intravitreal device providing sustained release of cyclosporine and dexamethasone. *Curr Eye Res.* 1996;15:549-57.

Fang W, Yang P. Vogt-koyanagi-harada syndrome. *Curr Eye Res.* 2008;33:517-23.

Fialho SL, Rego MB, Siqueira RC, Jorge R, Haddad A, Rodrigues AL, Maia-Filho A, Silva-Cunha A. Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. *Curr Eye Res.* 2006;31:525-34.

Fialho SL, Behar-Cohen F, Silva-Cunha A. Dexamethasone-loaded poly(epsilon-caprolactone) intravitreal implants: a pilot study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68:637-46.

Foxwell BM, Woerly G, Ryffel B. Inhibition of interleukin 4 receptor expression on human lymphoid cells by cyclosporin. *Eur J Immunol.* 1990;20:1185-8.

Friemann S, Feuring E, Padberg W, Ernst W. Improvement of nephrotoxicity, hypertension, and lipid metabolism after conversion of kidney transplant recipients from cyclosporine to tacrolimus. *Transplant Proc.* 1998;30:1240-2.

Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:3686-90.

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

Geroski DH, Edelhauser HF. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52:37-48.

Gilger BC, Malok E, Stewart T, Horohov D, Ashton P, Smith T, Jaffe GJ, Allen JB. Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000;76:239-55.

Gimnig JE, MacArthur JR, M'Bang'ombe M, Kramer MH, Chizani N, Stern RS, Mkandala C, Newman RD, Steketee RW, Campbell CH. Severe cutaneous reactions to sulfadoxine-pyrimethamine and trimethoprim-sulfamethoxazole in Blantyre District, Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:738-43.

Gjorloff K, Andreasson S, Ehinger B. Standardized full-field electroretinography in rabbits. *Doc Ophthalmol.* 2004;109:163-8.

Graham RM. Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity. *Cleve Clin J Med*. 1994;61:308-13.

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

Harper CA, 3rd, Khoobehi B, Peyman GA, Gebhardt BM, Dunlap WA. Bioavailability of microsphere-entrapped cyclosporine A in the cornea and aqueous of rabbits. *Int Ophthalmol*. 1993;17:337-40.

Jaffe GJ, Martin D, Callanan D, Pearson PA, Levy B, Comstock T. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis: thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study. *Ophthalmology*. 2006;113:1020-7.

Jorge R, Costa RA, Calucci D, Cintra LP, Scott IU. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). *Retina*. 2006;26:1006-13.

Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*. 1989;321:1725-38.

Kilmartin DJ, Forrester JV, Dick AD. Cyclosporine-induced resolution of choroidal neovascularization associated with sympathetic ophthalmia. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:249-50.

Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N. Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res*. 2001;131:3-26.

Kulkarni P. Review: uveitis and immunosuppressive drugs. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2001;17:181-7.

Kuppermann BD, Blumenkranz MS, Haller JA, Williams GA, Weinberg DV, Chou C, Whitcup SM. Randomized controlled study of an intravitreal dexamethasone drug delivery system in patients with persistent macular edema. *Arch Ophthalmol*. 2007;125:309-17.

Lafferty KJ, Borel BJ, Hodgkin P. Cyclosporin A (CsA): models for the mechanism of action. *Transplant Proc.* 1983;15(4):2242-7.

Lallemant F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, Behar-Cohen F, Gurny R. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;56:307-18.

Lamb TD, Pugh EN, Jr. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:5137-52.

Lee SS, Hughes P, Ross AD, Robinson MR. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. *Pharm Res.* 2010;27:2043-53.

Lim KS, Wickremasinghe SS, Cordeiro MF, Bunce C, Khaw PT. Accuracy of intraocular pressure measurements in new zealand white rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2419-23.

Lim JI, Wolitz RA, Dowling AH, Bloom HR, Irvine AR, Schwartz DM. Visual and anatomic outcomes associated with posterior segment complications after ganciclovir implant procedures in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol.* 1999;127:288-93.

Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation.* 1999;68:55-62.

Mannermaa E, Vellonen KS, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:1136-63.

Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol.* 1998;97:143-56.

Masuda K, Nakajima A, Urayama A, Nakae K, Kogure M, Inaba G. Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behcet's disease. *Lancet.* 1989;1: 1093-6.



Messias A, Gekeler F, Wegener A, Dietz K, Kohler K, Zrenner E. Retinal safety of a new fluoroquinolone, pradofloxacin, in cats: assessment with electroretinography. *Doc Ophthalmol.* 2008;116:177-91.

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.

Nair LS, and Laurencin CT. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2006;102:47-90.

Nussenblatt RB, Palestine AG, Chan CC. Cyclosporin A therapy in the treatment of intraocular inflammatory disease resistant to systemic corticosteroids and cytotoxic agents. *Am J Ophthalmol.* 1983;96:275-82.

Nussenblatt RB, Palestine AG, Chan CC. Cyclosporine therapy for uveitis: long-term followup. *J Ocul Pharmacol.* 1985;1:369-82.

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

Paccola L, Costa RA, Folgosa MS, Barbosa JC, Scott IU, Jorge R. Intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for treatment of refractory diabetic macular oedema (IBEME study). *Br J Ophthalmol.* 2008;92:76-80.

Pearson PA, Jaffe GJ, Martin DF, Cordahi GJ, Grossniklaus H, Schmeisser ET, Ashton P. Evaluation of a delivery system providing long-term release of cyclosporine. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:311-17.

Penn RD, Hagins WA. Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. *Nature.* 1969;223:201-4.

Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation.* 1997;63:977-83.

Rêgo MGB. Liberação Prolongada de Dexametasona Intravítrea em Coelhos Através de um Sistema Biodegradável. In: *Oftalmologia*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2005, 94p.

Remuzzi G, Perico N. Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int.* 1995;Suppl 52:S70-4.

Roth DB, Flynn HW, Jr. Antibiotic selection in the treatment of endophthalmitis: the significance of drug combinations and synergy. *Surv Ophthalmol.* 1997;41:395-401.

Saliba JB FA, Yoshida MI, Vasconcelos WL, Silva-Cunha A, Mansur HS. Development and Characterization of an Intraocular Biodegradable Polymer System Containing Cyclosporine-A for the Treatment of Posterior Uveitis. *Materials Research Bulletin.* 2008;11:207-11.

Saliba JB. Avaliação Biológica de Implantes Biodegradáveis Contendo Ciclosporina (A) de Administração Intravítrea. In: *Farmacologia*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011, 157 p.

Saliba JB S-CA, Gomes ECL, Mansur HS, Silva GR. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for determination of cyclosporine-a from biodegradable intraocular implants. *Química Nova.* 2011;34:140-4.

Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology.* 2000;107:631-9.

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.

Saricaoglu H, Bulbul EB, Cikman ST, Dilek K, and Tunali S. Effects of long-term cyclosporine A therapy on renal functions in Behcet's disease. *Int J Tissue React.* 2004;26:93-6.

Smith TJ, Pearson PA, Blandford DL, Brown JD, Goins KA, Hollins JL, Schmeisser ET, Glavinis P, Baldwin LB, Ashton P. Intravitreal sustained-release ganciclovir. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:255-58.

Souza ER, Boim MA, Bergamaschi C, Versolato C, Pestana JO, Schor N. Acute effects of FK 506 on glomerular hemodynamics. *Transplant Proc.* 1992;24:3082.

Thorp M, DeMattos A, Bennett W, Barry J, Norman D. The effect of conversion from cyclosporine to tacrolimus on gingival hyperplasia, hirsutism and cholesterol. *Transplantation.* 2000;69:1218-20.

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

Vitale AT, Rodriguez A, Foster CS. Low-dose cyclosporine therapy in the treatment of birdshot retinochoroidopathy. *Ophthalmology.* 1994;101:822-31.

Walton RC, Nussenblatt RB, Whitcup SM. Cyclosporine therapy for severe sight-threatening uveitis in children and adolescents. *Ophthalmology.* 1998;105:2028-34.

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, Kimura H, Tabata Y, Miyamoto H, Honda Y, Ogura Y. Sustained release of cis-hydroxyproline in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002;240:672-8.

Yasukawa T, Ogura Y, Sakurai E, Tabata Y, Kimura H. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:2033-46.

## 8. ANEXO

---

**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 144/2008, sobre o projeto intitulado “*Estudo de farmacocinética vítrea e toxicidade retiniana da ciclosporina intra-vítrea em olhos de coelhos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Andre Marcio Vieira Messias** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **30 de novembro de 2009**.

(We certify that the protocol n° 144/2008, about “*Study of infra-vitreous cyclosporine pharmacokinetics and retinal toxicity in rabbit eyes*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 11/30/2009 meeting.

Ribeirão Preto, 30 de novembro de 2009.

  
**Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

## ANEXO DE PUBLICAÇÃO

---

**Estudo da farmacocinética vítrea e toxicidade da ciclosporina intravítrea em olhos de coelhos.**

**Pharmacokinetic and toxicity study of intravitreal cyclosporine in rabbits eyes.**

Felipe Piacentini Paes de Almeida MD<sup>1</sup>, Juliana Barbosa PhD<sup>2</sup>, Jefferson Augusto Santana Ribeiro MD, PhD<sup>1</sup>, Rubens Camargo Siqueira MD, PhD<sup>1</sup>, Armando Silva-Cunha PhD<sup>2</sup>, Rodrigo Jorge MD, PhD<sup>1</sup>, Andre Messias MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

**Corresponding Author:**

Prof. Dr. André M. Vieira Messias. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Avenida Bandeirantes 3900. Ribeirão Preto-SP, 14049-900, Brazil.

Tel./FAX: + 55 (16) 3602-2860. E-mail: [amessias@usp.br](mailto:amessias@usp.br)

## Resumo

**Objetivo:** Investigar a segurança e eficácia de um implante formado por copolímero biodegradável de ácido lático e glicólico (PLGA) contendo ciclosporina (CsA) em olhos de coelhos. **Métodos:** Sistema biodegradável de liberação lenta de droga de PLGA foi desenvolvido para este estudo. Sessenta coelhos foram utilizados neste estudo, dos quais 38 receberam o implante intravítreo de PLGA contendo 350 µg de CsA e 22 somente os veículos sem a droga. Quatro coelhos do grupo CsA e dois do grupo controle foram sacrificados semanalmente para a coleta do vítreo e posterior estudo farmacocinético. Quatro animais de cada grupo foram escolhidos para terem a pressão intraocular aferida semanalmente, e seis deles foram submetidos a eletrorretinogramas (ERG) no início e ao final do estudo, de acordo com protocolo da Sociedade Internacional de Eletrofisiologia da Visão (ISCEV) sendo então sacrificados, e os olhos processados para estudos histológicos da retina. **Resultados:** O implante biodegradável de PLGA foi bem tolerado pelos coelhos. Nenhum sinal de inflamação ocular foi observado no exame de lâmpada de fenda e a pressão intraocular (PIO) se manteve estável durante o estudo. O período inferido para a liberação de 350 µg CsA contida no implante na cavidade vítrea por este sistema foi de 17 semanas. Não foram observadas alterações histológicas na retina dos coelhos de ambos os grupos, entretanto houve importante redução da onda b nas fases escotópicas da ERG no grupo CsA, indicando toxicidade na via dos bastonetes após as oito semanas de seguimento. **Conclusões:** O implante biodegradável de PLGA não causa qualquer alteração no ERG. Por outro lado, o implante contendo 350 µg CsA provoca padrão exclusivo de diminuição da onda b nas fases escotópicas do exame, indicando toxicidade na via dos bastonetes. No entanto, não houve qualquer alteração histológica na retina dos animais.

**Palavras-chave:** Retina, Coelho, Eletrorretinografia, Implantes biodegradáveis, Ciclosporina, Farmacocinética intravítrea.



---

**Abstract**

**Purpose:** To investigate the safety and pharmacokinetic efficacy of an intravitreal poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) biodegradable cyclosporine A (CsA) implant in rabbits eyes. **Methods:** A sustained-release drug delivery system comprising a biodegradable PLGA copolymer was developed to perform this study. Sixty rabbits have been assigned to receive either an intravitreal implant of PLGA biodegradable system with 350 µg of CsA (n=38), or without the compound as control group (n=22). Four animals of CsA group and 2 of control group were sacrificed weekly to have their vitreous samples collected for subsequent pharmacokinetic study. Four animals from each group were chosen to have intraocular pressure measured weekly and six of them underwent electroretinography (ERG) tests at baseline and at the end of the study, according to ISCEV protocol. Then they were sacrificed and had their eyes processed for histological studies of the retina. **Results:** The PLGA biodegradable system was well tolerated by the rabbits. No sign of inflammation was noticed on slit lamp examinations and IOP maintained stable during the study period. It was hypothetically calculated that CsA would take 17 weeks to be completely delivery by this system. Histologically the retina did not show alterations in both groups, but there was a significant reduction in the b wave of the scotopic ERG phases in the CsA group indicating toxicity of the rods pathway after 8 weeks of follow-up. **Conclusions:** The PLGA biodegradable system caused no ERG changes by itself; on the other hand, the 350 µg CsA implant caused impairment on rod pathway function after 8 weeks follow-up. PLGA implants with 350 µg of CsA does not cause retinal histological changes, but decreases b wave amplitude.

**Keywords:** Rabbits, Electroretinography, Biodegradable implant, Intravitreal drug delivery, Cyclosporine, Retina, Toxicity

## Introdução

Uveíte crônica é doença comum na oftalmologia e necessita de terapias a longo prazo para o seu tratamento. A ciclosporina A (CsA) tem sido opção para terapêutica para estes casos<sup>1,2</sup>, mas o tratamento de doenças oculares que acometem o vítreo e a retina é limitado pela baixa penetração das drogas até o segmento posterior do olho<sup>3,4</sup>. Casos em que altas concentrações de drogas no segmento posterior ocular são necessárias, a via mais comumente empregada é a injeção direta na cavidade vítrea, como, por exemplo, o anti-VEGF<sup>5</sup>, triancinolona<sup>6</sup> e antibióticos<sup>7</sup>. Entretanto, além dos riscos inerentes desse procedimento, como infecção, descolamento de retina e hemorragias, a curta meia-vida das drogas no vítreo frequentemente exige a repetição da aplicação para que se consiga manter os níveis terapêuticos, multiplicando os riscos do procedimento, assim como os riscos de toxicidade e o desconforto do paciente. Nesse contexto, é razoável inferir que sistemas que permitam liberação lenta e controlada de medicamentos intraoculares poderiam representar alternativa eficiente no tratamento de doenças oculares que necessitem da manutenção de níveis terapêuticos das drogas por período prolongado no vítreo e sem os indesejados efeitos colaterais<sup>8,9</sup>.

Sistemas de liberação de drogas, que disponibilizam CsA no segmento posterior do olho, ainda são pouco explorados. Neste estudo, foi desenvolvido e avaliado *in vivo*, um novo implante de PLGA contendo CsA. A farmacocinética e o tempo de liberação da droga foram analisados, assim como a sua biocompatibilidade, por meio de avaliações clínicas, histológicas e do perfil toxicológico do implante na função retiniana de coelhos.

## Material e Métodos

O implante de polímero PLGA 75:25 (75% ácido glicólico e 25% de ácido láctico) foi desenvolvido no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)<sup>10</sup>. A CsA é incorporada ao polímero, resultando em um sistema compacto, homogêneo e cilíndrico, composto por 68,4% de PLGA e 31,6% de CsA, com tamanho aproximado de 0,45 mm de diâmetro, 5 a 6 mm de comprimento, pesando cerca de 1,1 mg, contendo aproximadamente 353 µg de CsA. Implantes com tamanho e peso similares, mas sem a CsA, foram utilizados para implantação nos animais do grupo controle.

Sessenta coelhos fêmeas Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), pesando 1,5 kg a 2,0 kg, foram usados nesta pesquisa, de acordo com as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) para estudo em animais. Os 60 animais foram divididos em dois grupos. O grupo CsA foi composto por 38 coelhos, que receberam o implante intraocular de PLGA contendo CsA e o grupo controle, com 22 animais, que receberam o implante intraocular sem CsA. Os implantes foram colocados nos olhos direitos dos coelhos com auxílio de kit de vitrectomia (Alcon<sup>®</sup> de 25 Gauge), seguido de instilação de antibiótico tópico ao fim do procedimento. Quatro coelhos do grupo CsA e dois do grupo controle foram sacrificados semanalmente, durante as oito semanas de estudo, para coleta de amostras de vítreo e análise da CsA intravítrea e dos implantes em degradação.

Exames de biomicroscopia, oftalmoscopia indireta e tonometria (tonômetro de Perkins) foram realizados em quatro animais de cada grupo pelo mesmo examinador antes da colocação do implante e depois semanalmente durante o período estudado. Seis animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, tiveram a sua função retiniana

---

avaliada ao exame de ERG (Colordome; Diagnosys LLC, Littleton, MA), 24 horas antes e oito semanas depois da colocação do implante. O exame foi dividido em duas fases: fase 1 ou escotópica (adaptação ao escuro durante no mínimo 120 minutos) para o estudo dos bastonetes e fase 2 ou fotópica (adaptação à luz de 10 minutos) para se estudarem os cones. Após o sacrifício destes 12 animais (6 de cada grupo), o olho direito foi enucleado e processado para estudos histológicos.

## Resultados

Durante as oito semanas de experimento foram liberados  $19,4\% \pm 8,2\%$  e  $42,8\% \pm 11,7\%$  de CsA, respectivamente, na primeira e última semanas do estudo (Figura 1). Os valores obtidos indicam que a liberação do fármaco pelo implante aumenta continuamente com o passar do tempo. Encontrou-se correlação estatisticamente significativa entre a percentagem de CsA liberada pelo dispositivo e o tempo após o implante, com  $r = 0,69$  ( $P < 0,0001$ ), mostrando que há aumento significativo da liberação do fármaco de  $3,3 \pm 0,7\%$  por semana, durante o período estudado. A massa polimérica dos implantes de PLGA mostrou-se estável até a terceira semana quando apresentou diminuição da sua massa na taxa de  $3,8 \pm 0,7\%$  por semana, com perda média de  $22,8\% \pm 3,8\%$  na oitava semana do estudo. Houve liberação de cerca de 25% de CsA pelo implante, antes do início da sua degradação. A concentração de CsA no vítreo mostrou-se estável nas primeiras quatro semanas, com valores em torno de 19,3 ng/ml. Nas três aferições seguintes, os valores encontrados no vítreo aumentaram significativamente alcançando 85,13 ng/ml na semana 7.

A inspeção ocular no período pós-operatório imediato revelou hiperemia conjuntival no local da inserção do trocarte/cânula, com resolução espontânea até o

---

terceiro dia após o procedimento. Um coelho do grupo CsA apresentou discreta turvação vítrea, não associada com sinais de infecção ocular, na terceira semana do estudo, e um animal do grupo controle apresentou quadro de inflamação ocular classificada como endoftalmite e glaucoma neovascular no 14º dia após colocação do implante e foi excluído do estudo. Nenhum animal apresentou opacidade do cristalino, hemorragias vítreas, descolamento de retina, dilatação dos vasos retinianos ou neovascularização retiniana. Na maioria dos olhos, o implante permaneceu na base vítrea próximo à esclerotomia, indicando baixa mobilidade na cavidade vítrea. As medidas tonométricas mostraram discreto aumento da pressão média (aproximadamente 2 mmHg) nos dois grupos na 1ª semana após colocação do implante, sem diferença estatística significativas intra ou entre os grupos.

Ao exame histopatológico, as retinas de todos os animais do grupo controle e CsA, apresentaram aspectos microscópicos normais em todos os olhos avaliados histologicamente após as oito semanas de estudo. Não foram observados sinais de necrose, perda de fotorreceptores, restos celulares, degeneração cística, infiltrados inflamatórios ou hipocelularidade das camadas nucleares. O corpo dos fotorreceptores encontrava-se intacto, sem sinais de picnose. Também não foram encontradas alterações na camada de células ganglionares e no epitélio pigmentado para nenhuma das camadas avaliadas.

O grupo CsA mostrou diminuição estatisticamente significativa intra e entre os grupos na amplitude da onda b nos três estímulos na fase escotópica (luminâncias de 0,01, 3,0 e 10,0 cd.s/m<sup>2</sup>), da latência da onda b no estímulo de alta intensidade e da razão b/a para o estímulo 3,0 cd.s/m<sup>2</sup>. Deve-se ressaltar que no período em que a redução da onda b do ERG foi medida, histologicamente, a retina estava normal, com

---

sua morfologia preservada em todas as camadas. A análise dos dados colhidos durante a fase fotópica do ERG mostrou que não houve diferenças estatísticas entre as medidas de suas respostas, tanto das amplitudes da onda b quanto dos períodos de latência aos estímulos de 3,0 cd.s/m<sup>2</sup> com fundo de 30 cd/m<sup>2</sup> (fase Cone) e o 30 Hz *Flicker*, quando comparados os exames dos grupos CsA. Nos exames do grupo controle não foi notada qualquer alteração quando comparados os exames iniciais e após oito semanas, tanto na fase escotópica quanto na fotópica (Figura 2 e Tabela 1).

### **Discussão**

O tratamento farmacológico ideal deve promover resolução da morbidade, apresentando baixa toxicidade e posologia confortável. Nenhuma estratégia terapêutica utilizada na prática oftalmológica com injeções intraoculares ou implantes intravítreos de liberação lenta de fármacos atinge esses objetivos<sup>11,12</sup>. Neste estudo, a curva de liberação do fármaco apresentou padrão semelhante ao observado anteriormente com matrizes poliméricas biodegradáveis a base de polímeros derivados dos ácidos lático e glicólico. Observou-se aumento abrupto (“burst”) inicial na primeira semana do estudo, quando a CsA na superfície do implante foi liberada. A partir de então, ocorre o processo de difusão por meio da matriz porosa, e a liberação da droga é mais lenta e uniforme; sendo este o principal mecanismo para a liberação do fármaco durante o período estudado. A quantidade de CsA liberada pelo implante foi muito semelhante à quantidade de eliminação da droga pelo vítreo, estimando-se que esta eliminação foi de 99,9%, não havendo saturação de CsA no vítreo e a meia-vida da droga foi estável durante o período estudado<sup>13</sup>. O tempo planejado para o experimento foi insuficiente para determinar todas as etapas de liberação da CsA e apenas 42,8% do total de CsA

---

contida no implante foi liberada durante as oito semanas estudadas. A fase terciária, etapa que pode liberar altas doses do fármaco, caracterizada pela desintegração da matriz não foi observada, visto que houve perda de apenas 22,8% da massa do implante durante todo o estudo<sup>9</sup>. Estudos mais longos devem ser realizados a fim de se verificar o comportamento do implante nas fases mais tardias.

Dong et al. (2006)<sup>14</sup> usaram implante biodegradável semelhante contendo CsA em modelo experimental de uveíte crônica em coelhos por um período de 14 semanas. Esses autores relataram ter atingido doses intravítreas de 450 a 600 ng/ml, obtendo controle do processo inflamatório no grupo tratado. Em tal estudo, o ERG foi utilizado para avaliar os efeitos da deterioração da função retiniana decorrente do processo inflamatório, e menor perda de amplitude da onda b do ERG foi descrita nos coelhos tratados, em virtude da melhora da uveíte nesses animais tratados com CsA. O estudo não fornece detalhes acerca dos resultados eletrorretinográficos, mas a discrepância com os achados do presente estudo é evidente, visto que o componente do ERG mais acometido pela toxicidade da CsA, observada na presente pesquisa com dose significativamente menor, foi a amplitude da onda b. Possivelmente, a presença da uveíte e/ou das diferenças do período de exposição da retina à CsA e a reversibilidade da sua toxicidade podem ser as causas das diferenças dos dois estudos<sup>14,15</sup>. Gilger et al. (2000) usaram dispositivo discoide não-biodegradável de álcool polivinílico contendo 0,5 mg de CsA para tratamento bem sucedido de uveíte autoimune induzida em cavalos, e relataram taxa de liberação de 2 µg/dia e concentração média dos níveis de CsA intravítreo de 52 ±15 ng/ml. A duração e severidade da inflamação, do infiltrado celular, da destruição tecidual e dos níveis de citocinas inflamatórias foram significativamente menores nos olhos que receberam os implantes com CsA<sup>16</sup>.

---

Com o implante usado neste trabalho alcançou-se concentração de 84,13 ng/ml na última dosagem de CsA intravítrea (7<sup>a</sup> semana), que está dentro dos limites terapêuticos estimados para o controle de uveítes<sup>17</sup>. A taxa de eliminação estimada da CsA foi de aproximadamente 3,0 µg/dia, e a meia-vida de 69,3 dias. Dessa forma, seriam necessárias 17 semanas para a completa eliminação dos 350 µg de CsA presente nos implantes<sup>10</sup>, período longo o suficiente para aliviar a necessidade de retratamento, muitas vezes mensal, de muitas estratégias terapêuticas.

Neste estudo não foi notado opacidades cristalínias, como descrito na literatura previamente<sup>15</sup>. Com relação às medidas tonométricas, observou-se discreto aumento da pressão intraocular (PIO) em ambos os grupos nas aferições da semana 1, mas sem significância estatística (aproximadamente 2 mmHg). Nas semanas subsequentes, as medidas tonométricas foram semelhantes à encontrada na avaliação inicial. Entretanto, em outro estudo no qual os implantes foram colocados via esclerotomia de 19 Gauge sem o uso de trocartes, foi notada tendência à queda nos valores tonométricos de 2 a 3 mmHg na primeira semana após o procedimento, sendo tal diminuição atribuída à perda vítrea ocorrida no momento da esclerotomia<sup>18</sup>. A colocação do implante pode justificar o aumento da PIO nos exames da semana 1 deste estudo, já que as perdas vítreas foram muito discretas devido à utilização de sistema de 25 Gauge para a realização do procedimento. Além disso, o sistema de menor calibre permite que a cirurgia seja mais rápida, pois dispensa sutura.

A diminuição da onda b provocada pela CsA já foi previamente descrita nas fases fotópicas e escotópicas e é reversível<sup>15,19</sup>. Os resultados do presente estudo mostraram que os dados colhidos durante a fase fotópica do ERG não apresentaram diferenças estatísticas entre as medidas das respostas do ERG, tanto das amplitudes da



---

onda b quanto dos períodos de latências aos estímulos durante a fase Cone e 30 Hz *Flicker*, quando comparados os exames dos grupos CsA e controle no exame inicial e na semana 8. Por outro lado, houve diminuição exclusiva da onda b nos animais que receberam o implante com CsA no vítreo. Esse padrão de resposta é, muitas vezes, denominado “ERG negativo”, e é encontrado em patologias com alterações específicas de estruturas retinianas, que geram esse potencial positivo, sem mudanças na geração da onda a. Exemplos destas alterações são: cegueira noturna estacionária congênita, ou a retinosquise juvenil ligada ao X, doenças com isquemia severa da retina, como na fase aguda da oclusão da artéria central da retina, ou retinopatia diabética avançada, sugerindo efeitos tóxicos nas células de Müller e bipolares. Como a onda b é gerada principalmente pela despolarização das células bipolares ON dos bastonetes, pode-se inferir que a anormalidade observada deve ter alguma ligação com as alterações funcionais dessas células<sup>15</sup>.

Quanto à biocompatibilidade e toxicidade, não ocorreu nenhuma alteração nos olhos dos animais que receberam os implantes, mas leve grau de comprometimento na função retiniana foi detectado no grupo que recebeu os implantes contendo CsA. No entanto, esse sinal de toxicidade é provavelmente reversível após a total eliminação do fármaco. Se faz necessário testar os mesmos implantes com concentrações inferiores de CsA, a fim de se determinar a concentração segura e clinicamente efetiva deste medicamento nos implantes intraoculares.

---

**Referências Bibliográficas**

1. Sullu Y, Oge I, Erkan D, Ariturk N, and Mohajeri F. Cyclosporin-A therapy in severe uveitis of Behcet's disease. *Acta Ophthalmol Scand* 76: 96-99, 1998.
2. Vitale AT, Rodriguez A, and Foster CS. Low-dose cyclosporin A therapy in treating chronic, noninfectious uveitis. *Ophthalmology* 103: 365-373; discussion 373-364, 1996.
3. Mannermaa E, Vellonen KS, and Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 1136-1163, 2006.
4. Velez G, and Whitcup SM. New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular disease. *Br J Ophthalmol* 83: 1225-1229, 1999.
5. Jorge R, Costa RA, Calucci D, Cintra LP, and Scott IU. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). *Retina* 26: 1006-1013, 2006.
6. Paccola L, Costa RA, Folgosa MS, Barbosa JC, Scott IU, and Jorge R. Intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for treatment of refractory diabetic macular oedema (IBEME study). *Br J Ophthalmol* 92: 76-80, 2008.
7. Roth DB, and Flynn HW, Jr. Antibiotic selection in the treatment of endophthalmitis: the significance of drug combinations and synergy. *Surv Ophthalmol* 41: 395-401, 1997.
8. Ambati J, Gragoudas ES, Miller JW, You TT, Miyamoto K, Delori FC, and Adamis AP. Transscleral delivery of bioactive protein to the choroid and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1186-1191, 2000.

- 
9. Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, and Ogura Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 52: 25-36, 2001.
  10. Saliba JB. Avaliação Biológica de Implantes Biodegradáveis Contendo Ciclosporina (A) de Administração Intravítrea. In: *Farmacologia*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011, p. 157.
  11. Geroski DH, and Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 961-964, 2000.
  12. Lim JI, Wolitz RA, Dowling AH, Bloom HR, Irvine AR, and Schwartz DM. Visual and anatomic outcomes associated with posterior segment complications after ganciclovir implant procedures in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol* 127: 288-293, 1999.
  13. Saliba JB S-CA, Gomes ECL, Mansur HS, Silva GR. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for determination of cyclosporine-a from biodegradable intraocular implants. *Química Nova* 34: 140-144, 2011.
  14. Dong X, Shi W, Yuan G, Xie L, Wang S, and Lin P. Intravitreal implantation of the biodegradable cyclosporin A drug delivery system for experimental chronic uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244: 492-497, 2006.
  15. Pearson PA, Jaffe GJ, Martin DF, Cordahi GJ, Grossniklaus H, Schmeisser ET, and Ashton P. Evaluation of a delivery system providing long-term release of cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 114: 311-317, 1996.
  16. Gilger BC, Malok E, Stewart T, Horohov D, Ashton P, Smith T, Jaffe GJ, and Allen JB. Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 76: 239-255, 2000.

- 
17. Lafferty KJ Borel BJ, Hodgkin P. Cyclosporin A (CsA): models for the mechanism of action. . *Transplant Proc* 15: 2242-2247, 1983.
  18. Rêgo MGB. Liberação Prolongada de Dexametasona Intravítrea em Coelhos Através de um Sistema Biodegradável. In: *Oftalmologia*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2005, p. 94.
  19. Enyedi LB, Pearson PA, Ashton P, and Jaffe GJ. An intravitreal device providing sustained release of cyclosporine and dexamethasone. *Curr Eye Res* 15: 549-557, 1996.

**Legendas de figuras**

**Figura 1:** Porcentagem semanal de liberação da CsA do implante de PLGA no vítreo de coelhos, durante oito semanas. Pontos indicam as médias e as barras verticais o erro padrão da média.

**Figura 2:** ERG de olhos de coelhos com implante de PLGA com e sem CsA aplicada no vítreo após adaptação ao escuro. Os gráficos superiores correspondem ao grupo controle e mostram curvas normais antes do implante e na semana 8 do estudo. Nos gráficos inferiores, observa-se que no grupo tratado com CsA houve diminuição da amplitude da onda b no exame da semana 8 nas luminâncias de 0,01, 3,0 e 10,0 cd.s/m<sup>2</sup>.

Figura 1

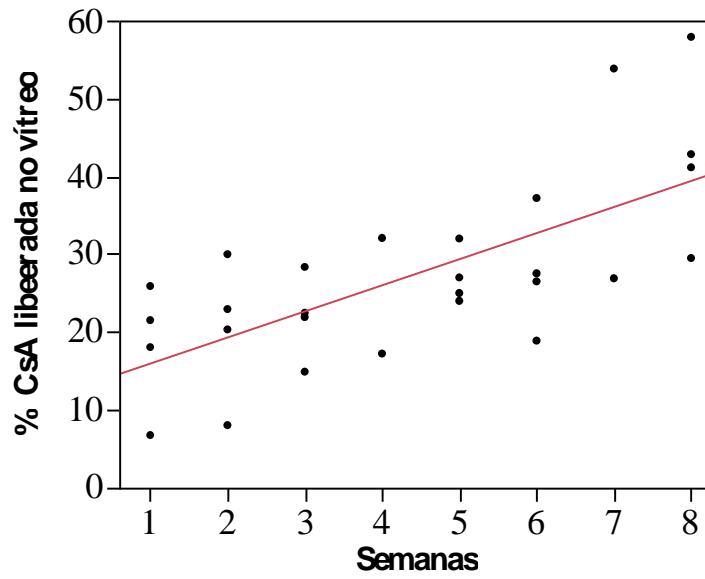
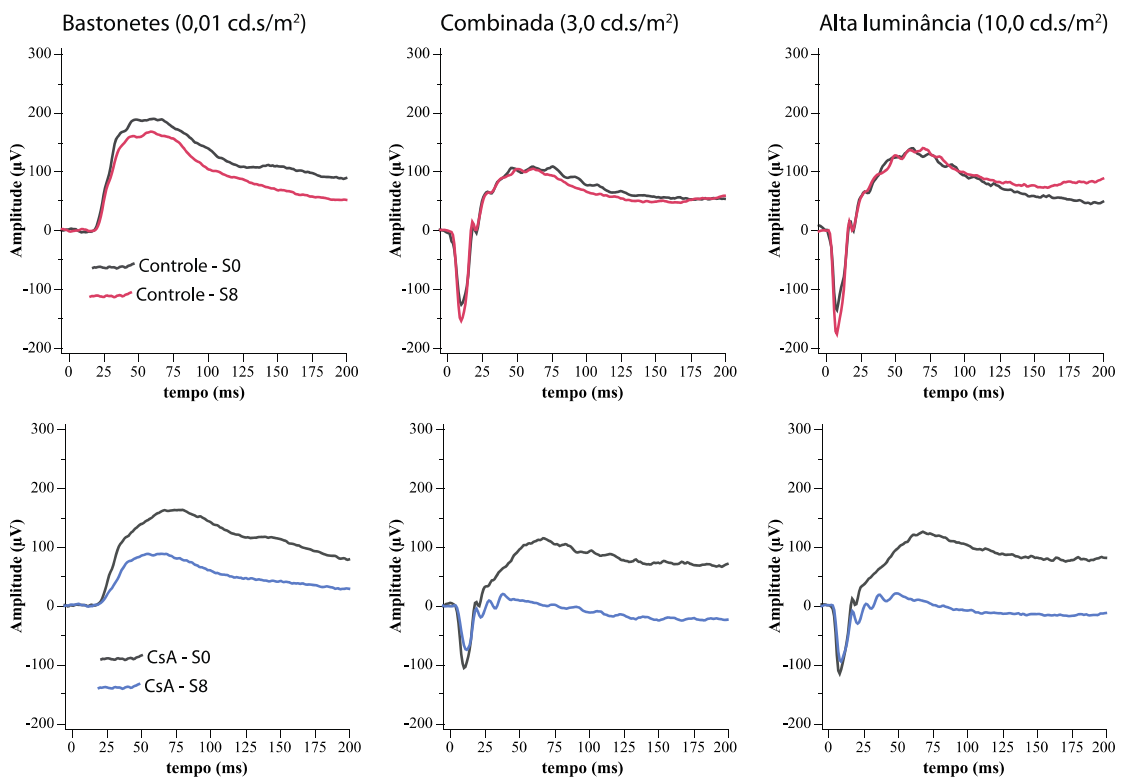


Figura 2



**Tabela 1:** Média  $\pm$  erro padrão do ERG escotópico no exame inicial (S0) e na semana 8 (S8) de seguimento, nos animais dos grupos controle e com CsA. Células com fundo cinza realçam valores estatisticamente diferentes intra e entre os grupos.

		Controle		CsA	
		S0	S8	S0	S8
Bastonetes (0,01 cd.s/m <sup>2</sup> )	Amplitude onda b ( $\mu$ V)	209,8 $\pm$ 28,6	215,0 $\pm$ 19,7	194,6 $\pm$ 10,3	112,6 $\pm$ 17,7 (p=0,0433)
	Latência onda b (ms)	65,8 $\pm$ 2,7	65 $\pm$ 2,5	64,3 $\pm$ 7,1	51,8 $\pm$ 4,4
Combinada (3,0 cd.s/m <sup>2</sup> )	Amplitude onda a ( $\mu$ V)	144,3 $\pm$ 15	124,4 $\pm$ 15,1	139,0 $\pm$ 12,2	139,2 $\pm$ 21,8
	Latência onda a (ms)	10,0 $\pm$ 0,0	11,5 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,0	10,5 $\pm$ 0,5
	Razão b/a	2,1 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1 (p=0,0209)
	Amplitude onda b ( $\mu$ V)	301,2 $\pm$ 44,7	313,6 $\pm$ 25,8	277,1 $\pm$ 18,6	158,7 $\pm$ 23,7 (p=0,0433)
	Latência onda b (ms)	63,0 $\pm$ 4,3	75,5 $\pm$ 3,7	65,8 $\pm$ 1,4	43,5 $\pm$ 3,2 (p=0,0033)
	Potenciais Oscilatórios ( $\mu$ V.ms)	320,0 $\pm$ 44,9	303,2 $\pm$ 32,4	301,1 $\pm$ 23,1	344,6 $\pm$ 24,0
Alta intensidade (10,0 cd.s/m <sup>2</sup> )	Amplitude onda a ( $\mu$ V)	164,9 $\pm$ 14,0	146,0 $\pm$ 16,1	159,0 $\pm$ 15,9	163,4 $\pm$ 22,9
	Latência onda a (ms)	7,8 $\pm$ 0,3	8,8 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,3
	Amplitude onda b ( $\mu$ V)	345,1 $\pm$ 46,5	335,8 $\pm$ 19,4	303,4 $\pm$ 21,0	162,1 $\pm$ 22,2 (p=0,0259)
	Latência onda b (ms)	69,3 $\pm$ 2,3	68,3 $\pm$ 2,3	68,0 $\pm$ 1,9	50,3 $\pm$ 1,1 (p=0,0194)

S0: semana 0; S8: semana 8.