

# Sistema de liberação contendo ciclosporina para o tratamento de ceratoconjuntivite seca: estudo preliminar

## *Cyclosporine-loaded delivery system for the treatment of keratoconjunctivitis sicca: a pilot study*

Gustavo de Oliveira Fulgêncio<sup>1</sup>, Juliana Barbosa Saliba<sup>1</sup>, Sílvia Ligório Fialho<sup>2</sup>, Armando da Silva Cunha Júnior<sup>1</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** Este trabalho objetivou o desenvolvimento de um sistema mucoadesivo de liberação de ciclosporina A (CsA) para o tratamento de ceratoconjuntivite seca (CCS). **Métodos:** O sistema mucoadesivo foi preparado na forma de filme utilizando o polímero quitosana e CsA (25% p/v). Foram administrados no saco conjuntival do olho direito de coelhos normais (n=6) e a aferição da produção de lágrimas foi realizada diariamente antes e após a aplicação, de forma bilateral, durante sete dias, por meio do teste lacrimal de Schirmer. Avaliação oftalmológica foi realizada diariamente durante todo o estudo e seguido da análise histológica. **Resultados:** Os valores médios de produção de lágrimas foram alterados de  $9,88 \pm 0,37$  mm/min para  $16,02 \pm 0,38$  mm/min antes e após a administração do sistema respectivamente, significando um aumento de aproximadamente 60%. Todos os coelhos apresentaram hiperemia da conjuntiva palpebral e lacrimejamento. A hiperemia permaneceu durante 48 h após administração dos sistemas com resolução espontânea e o lacrimejamento foi diagnosticado até o final do experimento. Não foram observados outros sinais de reações indesejáveis. Nenhuma alteração histológica foi observada na mucosa conjuntival bulbar e palpebral à histopatologia. **Conclusão:** Os sistemas desenvolvidos são aparentemente seguros e eficientes criando expectativa para o tratamento da CCS. Novos estudos são necessários para avaliar a concentração de CsA liberada, assim como aceitabilidade e toxicidade dos sistemas em tratamentos mais prolongados.

**Descritores:** Ceratoconjuntivite seca/terapia; Ciclosporina/uso terapêutico; Sistemas de liberação de medicamentos

### ABSTRACT

**Purpose:** The present work aimed to present the development of a conjunctival mucosa system for the controlled delivery of cyclosporine A (CsA) in the treatment of keratoconjunctivitis sicca (KCS). **Methods:** The conjunctival mucosa system was prepared in the form of films containing chitosan as the polymer and CsA as the drug (25% w/v). The films were applied to the conjunctival sac of one eye from normal rabbits (n=6), and the evaluation of lachrymal production was performed daily, before and after application, for seven days. Clinical examination was executed daily on the eyes of each animal during the entire period of study. Histological analyses were carried out at the end of the study. **Results:** The average amount of lachrymal production changed from  $9.88 \pm 0.37$  mm/min to  $16.02 \pm 0.38$  mm/min, respectively, before and after applying the systems, which indicates an increase of approximately 60%. All rabbits presented hyperemia in the palpebral conjunctiva and tearing. Hyperemia continued for 48h after the application of the systems with spontaneous resolution, and tearing was diagnosed throughout the entire study. No other sign of undesirable reactions could be observed. Moreover, no histological changes could be identified in the bulbar and palpebral conjunctival mucosa. **Conclusion:** The developed systems proved to be safe and efficient in this pilot study and present a promising future for the treatment of KCS. Other studies are warranted to evaluate the released concentration of CsA as well as the feasibility and toxicity of these systems in a more prolonged treatment.

**Keywords:** Keratoconjunctivitis sicca/therapy; Cyclosporine/therapeutic use; Drug delivery system

<sup>1</sup> Doutor, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Belo Horizonte (MG), Brasil;

<sup>2</sup> Doutora, divisão de Desenvolvimento Farmacotécnico e Biotecnológico da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte – (MG), Brasil.

**Fontes de auxílio à pesquisa:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig)

**Os autores declaram não haver conflitos de interesse**

Recebido para publicação em 15/9/2012 - Aceito para publicação em 28/2/2013

## INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite seca (CCS), ou síndrome do olho seco, é uma doença multifatorial relacionada à grande evaporação ou diminuição da produção de lágrimas com consequente hiperosmolaridade lacrimal<sup>(1)</sup>. Os principais sintomas oculares associados à doença incluem desconforto, fotofobia, instabilidade do filme lacrimal, visão turva e deficiência visual<sup>(2)</sup>. Trata-se de um importante problema de saúde pública, podendo acometer até 15% da população em grupos específicos como os idosos<sup>(3)</sup>. A etiopatogenia é variada e está associada a fatores imunológicos, genéticos, terapêuticos, hormonais e ambientais<sup>(4)</sup>. O tratamento da CCS depende da gravidade da doença; na apresentação discreta baseia-se na administração de lágrimas artificiais, e em pacientes com a forma moderada e severa é recomendada a terapia com drogas imunossupressoras de uso tópico tais como a ciclosporina A (CsA)<sup>(5,6)</sup>.

A CsA é um potente agente imunossupressor isolado do fungo *Tolypocladium inflatum gams*, que atua inibindo a atividade de células T e suprimindo citocinas inflamatórias na conjuntiva e na glândula lacrimal<sup>(7,8)</sup>. Além disso, promove o aumento da densidade das células calciformes e redução da apoptose de células epiteliais na conjuntiva<sup>(9)</sup>. Desta forma, a CsA, por meio da supressão da inflamação no olho e nas glândulas lacrimais, apresenta efeito lacrimogênico, ou seja, aumenta a produção de lágrimas<sup>(4,6)</sup>.

O trabalho desenvolvido por Coster et al. (1979) foi pioneiro na utilização da CsA em oftalmologia, em que a droga foi aplicada em coelhos que receberam transplante de córnea<sup>(10)</sup>. Este trabalho foi seguido por estudos em humanos e posteriormente a droga se mostrou efetiva para o tratamento de diferentes inflamações na superfície ocular<sup>(11)</sup>. Desde 1995, encontra-se disponível no mercado uma preparação de pomada contendo CsA (Optimmune®, Schering-Plough, Brasil) para utilização em medicina veterinária no tratamento de CCS. Outra preparação tópica, na forma de emulsão, foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso no tratamento da síndrome do olho seco em humanos (Restasis® colírio, Allergan, Brasil) desde 2003. Portanto, a CsA se tornou amplamente prescrita para utilização tópica em diversas oftalmopatias e pela via sistêmica nas enfermidades autoimunes com envolvimento ocular<sup>(5,6)</sup>.

Devido à sua baixa solubilidade em água, a CsA é preparada utilizando veículos oleosos ou na forma de emulsões. Os colírios preparados utilizando estes veículos apresentam baixa absorção no epitélio da córnea, de forma que mais de 95% da droga atinge a circulação sistêmica pela absorção transnasal ou conjuntival<sup>(12)</sup>. Desta forma, para o controle da CCS são necessárias administrações frequentes que causam efeitos indesejáveis que incluem coceira, vermelhidão, ceratite, visão embaçada, e efeitos tóxicos na córnea, os quais limitam o uso e dificultam a adesão do paciente ao tratamento<sup>(1,6)</sup>.

Os sistemas de liberação prolongada permitem uma maior biodisponibilidade de drogas nos tecidos oculares, reduzindo a absorção sistêmica e, consequentemente, os efeitos indesejáveis. Eles são capazes de manter a concentração das drogas nos tecidos oculares, reduzindo a necessidade de administrações frequentes e os incômodos da aplicação tópica<sup>(13)</sup>.

Sistemas coloidais como as nanopartículas podem ser capazes de encapsular e proteger a droga, aumentar a tolerância, a penetração, a eficiência e a absorção na córnea<sup>(1,11)</sup>. Em um trabalho desenvolvido por Aksungur et al., foram desenvolvidas nanopartículas de ciclosporina para o tratamento de inflamação da superfície ocular. As nanopartículas desenvolvidas apresentaram liberação entre 75% e 90% da droga em 24h<sup>(1)</sup>.

Sistemas não coloidais também podem ser aplicados

topicamente pela via ocular. Estes sistemas se apresentam, geralmente, na forma de bastão, discos ou membranas e são obtidos por moldagem, extrusão e preparação de filmes. A preparação de filmes pode ser realizada por meio de fusão e pressão da mistura de pós ou por adição da solução. O método de adição da solução é o mais utilizado, sendo que os componentes são dissolvidos em um solvente apropriado formando uma solução que é, então, lançada sobre uma superfície lisa e não adesiva. O solvente se evapora, e o filme formado é retirado da superfície<sup>(14)</sup>.

Dentre os vários polímeros utilizados em sistemas de liberação de fármacos especificamente na forma de filmes, a quitosana vem se destacando na aplicação ocular tópica. Considerando que a córnea e a conjuntiva apresentam carga negativa, a utilização de polímeros mucoadesivos que possam interagir com estas estruturas poderia proporcionar um aumento do tempo de permanência do sistema na região pré-corneal ou *cul-de-sac* e consequente aumento da absorção da droga e do efeito terapêutico. A quitosana é um polímero catiônico, biodegradável, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação da quitina, abundante no exoesqueleto de crustáceos e outros animais marinhos<sup>(15,16)</sup>. A capacidade de mucoadesão e boa tolerância ocular são características importantes deste polímero que lhe conferem futuro promissor como matriz polimérica para filmes oculares mucoadesivos<sup>(15)</sup>. Em estudos preliminares, a quitosana apresentou resultados promissores no transporte ocular de drogas, aumentando o tempo de permanência na córnea de antibióticos e aumentando a penetração intraocular de nanocápsulas.

Na literatura científica são encontrados alguns trabalhos relacionados a sistemas de liberação à base de quitosana contendo CsA. Campos e colaboradores desenvolveram nanopartículas de quitosana contendo CsA que foram capazes de atingir concentrações terapêuticas da droga na córnea e na conjuntiva por 48 horas após administração tópica, e não foram encontrados níveis de concentração da droga nas estruturas internas do olho e no sangue<sup>(16)</sup>. Em outro trabalho, nanopartículas lipídicas contendo CsA foram preparadas e apresentaram boa biocompatibilidade e aumento da penetração da droga *in vitro* e *ex-vivo*<sup>(17)</sup>. Até o momento, não são encontrados trabalhos que descrevem a utilização de filmes mucoadesivos de quitosana e CsA para o tratamento de doenças que acometem a superfície ocular ou CCS.

Diante disso, este trabalho objetivou o desenvolvimento de um sistema de liberação de fármaco na forma de filme constituído de quitosana e CsA. O aumento da produção de lágrimas a partir da aplicação do sistema, assim como avaliação clínica e histológica foram avaliados após aplicação do sistema desenvolvido.

## MÉTODOS

### Materiais

Ciclosporina A [MM = 1202,61; solubilidade em água 27,67 µg/mL a 25°C<sup>(12)</sup>, Sigma-Aldrich, Brasil], quitosana de massa molecular média (viscosidade 200-800 cP em 1% ácido acético a 25°C, grau de desacetilação = 85 %, Sigma-Aldrich, Brasil), água ultrafiltrada (Milli Q plus, Millipore, EUA). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### Preparo dos filmes de quitosana contendo CsA

Foram preparados filmes de quitosana contendo três camadas, as quais foram denominadas F1, F2 e F3 (figura 1A). Para o preparo da camada F1, a quitosana foi solubilizada em uma solução de ácido acético a 2% e 2 ml desta solução foram adicionados a uma placa de petri e mantidos a temperatura ambiente até a secagem para formação do filme. Em seguida, uma segunda solução de ácido acético contendo quitosana (2% p/v) e CsA (25% p/v) foi

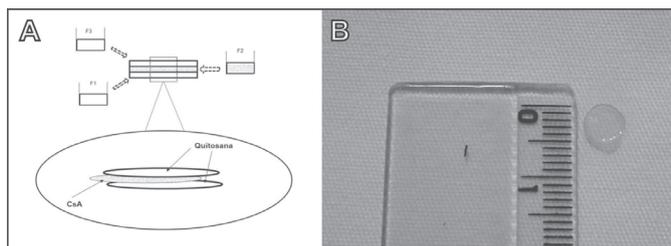


Figura 1: A: Esquema de preparo do filme de quitosana contendo CsA; B: Fotografia do filme de quitosana contendo CsA obtido

obtida. Desta solução, 2 ml foram adicionados sobre a camada F1 previamente preparada e foi mantida a temperatura ambiente até secagem para obtenção do filme composto por duas camadas (F2). Finalmente, adicionou-se sobre a camada F2, 2 ml de solução de quitosana 2% p/v em ácido acético e foi mantida a temperatura ambiente até a secagem para obtenção do filme composto por três camadas (F3). Após obtenção dos filmes, os mesmos foram cortados em formato de cilindros de 6 mm de diâmetro (figura 1B).

### Estudo *in vivo*

#### Animais

Foram utilizados seis coelhos albinos, machos, da raça *New Zealand*, com idade aproximada de três meses e peso entre 1,9 kg e 2,3 kg provenientes da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (Igarapé, Brasil). Os animais permaneceram em gaiolas individuais durante todo o período de adaptação e experimentação, em ambiente com temperatura média de 25°C, ventilação constante e luminosidade variando de acordo com a luz solar. Não houve restrição de água e alimento durante o experimento e a ração utilizada foi apropriada para espécie em questão.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA, Belo Horizonte, Brasil, Protocolo nº 130/08). Todo o experimento foi conduzido de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

#### Aplicação dos filmes

Anteriormente à aplicação, os filmes contendo quitosana e CsA desenvolvidos foram imersos por 10 segundos em solução salina para facilitar a administração e evitar o ressecamento da conjuntiva. Em seguida, após administração de colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®, Allergan, São Paulo, Brasil) no olho direito (OD), os filmes foram aplicados no saco conjuntival de coelhos normais por meio de tração da pálpebra inferior. O olho esquerdo (OE) não recebeu nenhum tratamento constituindo o grupo controle.

#### Avaliação do efeito na produção de lágrimas

Anteriormente à aplicação do filme, durante três dias, foram realizadas medidas de produção de lágrimas por meio do teste lacrimal de Schirmer (TLS) (Schirmer Tear Test®, Schering-Plough Animal Health, New Jersey, EUA) nos dois olhos de cada animal, diariamente às 14h, anteriormente ao exame oftalmológico. Após o terceiro dia e seguido da aplicação dos filmes de quitosana e CsA, a medida da produção de lágrimas foi continuada durante sete dias.

#### Avaliação clínica

Os coelhos foram submetidos ao exame clínico geral e oftalmológico durante todos os dias do experimento. A avalia-

ção oftálmica ocorreu com auxílio de fonte de luz apropriada (Lanterna Maglite®, Mag Instruments, Ontario, EUA) e foram utilizados tonômetro de aplanção (TonoPen® XL, Reichert Technologies, Buffalo, EUA), oftalmoscópio direto (Oftalmoscópio Heine® K180, Heine Optotecnik, Herrsching, Alemanha), biomicroscópio com lâmpada de fenda (Kowa® SL-15 Slit-lamp Biomicroscope, Tóquio, Japão) e oftalmoscópio indireto (Oftalmoscópio indireto binocular, Opto Eletrônica Ltda., São Paulo, Brasil). O acompanhamento por documentação fotográfica foi realizado em todos os bulbos oculares e anexos examinados, por meio de câmera digital (DSC HX-1®, Sony Company, Tóquio, Japão).

O exame clínico foi realizado por meio da avaliação dos principais parâmetros oftalmológicos, incluindo inspeção das pálpebras, sistema lacrimal e bulbo ocular. Patologias oculares superficiais como edema, ulceração ou neovascularização na córnea e hiperemia conjuntival foram investigados. A drenagem nasolacrimal foi avaliada com auxílio de corante de fluoresceína (Fluoresceína® - Allergan, São Paulo, Brasil). A lente e o segmento posterior do olho (vítreo, retina e coróide) foram examinados para identificação de catarata, opacidades vítreas e descolamento de retina.

#### Avaliação histológica

Após o sétimo dia de avaliação da produção de lágrimas, os animais foram eutanasiados utilizando dose letal de pentobarbital (100 mg/Kg) (Hypnol®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, Brasil) para remoção do bulbo ocular e posterior avaliação histológica do local de aplicação do filme desenvolvido. Os bulbos oculares foram removidos por meio de incisão no fórnice conjuntival. Amostras das pálpebras inferiores também foram coletadas. A secção do bulbo foi realizada no sentido do plano ântero-posterior, formando um meridiano do nervo óptico até a córnea. Em seguida, fatias do bulbo ocular e da pálpebra foram fixadas em solução de formol tamponado (pH 7,2) a 10%, desidratadas, diafanizadas, embebidas e incluídas em parafina e, finalmente, cortadas com espessura de 4-5 µm em micrótomo, com posterior montagem em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas pela coloração hematoxilina e eosina e analisadas ao microscópio óptico de luz (microscópio óptico de luz, Carl Zeiss, Herrsching, Alemanha).

## RESULTADOS

### Estudo *in vivo*

#### Avaliação do efeito na produção de lágrimas

A média de produção de lágrimas nos olhos dos coelhos foi de  $9,88 \pm 0,37$  mm/min e  $10,29 \pm 0,31$  mm/min no OD e OE, respectivamente, durante os três dias anteriores à administração do filme. Não houve diferença significativa na produção de lágrima entre os olhos durante este período ( $p=0,1372$ ) (figura 2A).

Após a aplicação do filme desenvolvido, observou-se um aumento de aproximadamente 60% da produção de lágrima, cujos valores médios, alteram de  $9,88 \pm 0,37$  mm/min para  $16,02 \pm 0,38$  mm/min (figuras 2A e 2B). Os valores encontrados no OD dos animais apresentam diferença significativa com relação aos valores anteriores à aplicação do filme ( $p<0,0001$ ). O OE, utilizado como controle, não apresentou alteração significativa ( $p=0,7332$ ) no que se refere à produção de lágrimas (valor médio de  $10,00 \pm 0,39$  mm/min). Trabalhos anteriores demonstraram que os mesmos sistemas sem fármaco, administrados em olhos de coelhos não

apresentaram aumento da produção de lágrimas<sup>(18)</sup>.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., USA) e foram expressos como a média da produção de lágrimas. A significância estatística da diferença foi determinada pelo teste *t* de Student não pareado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

### Avaliação clínica

No exame oftalmológico, todos os animais apresentaram hiperemia da conjuntiva palpebral e lacrimejamento (figura 3A). A hiperemia permaneceu durante 48h após administração dos filmes com resolução espontânea, entretanto, o lacrimejamento foi diagnosticado até o final do experimento (figura 3B). Não foram observados sinais de incômodo e dor ocular como prurido, blefaroespasmos ou fotofobia, além de não terem sido evidenciados edema e neovascularização corneais. O filme administrado apresentou um aspecto de gel após algumas horas em todos os animais permanecendo aderido à mucosa conjuntival. O corante de fluoresceína não evidenciou ceratite ulcerativa nem tampouco a obstrução do canal nasolacrimal. Com relação à avaliação dos meios intraoculares, não foram observados sinais de catarata, opacidades do vítreo e descolamento de retina.

### Avaliação histológica

Nenhuma alteração histológica foi observada na mucosa conjuntival bulbar e palpebral, ou seja, estruturas em contato direto com o filme desenvolvido. O epitélio e células adjacentes estavam normais constituindo o arcabouço característico de cada estrutura com ausência de sinais de toxicidade celular e vascular como acantose, hiperqueratose, infiltrado inflamatório, congestão vascular e hemorragia (figuras 4A e 4B).

## DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido realizados nas últimas décadas no que se refere ao desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas para administração oftálmica. Com relação à via tópica, especificamente, o objetivo consiste no aumento da penetração de drogas na córnea visando melhorar a eficácia do tratamento de diferentes doenças oculares<sup>(16,19)</sup>.

A CsA constitui um dos principais medicamentos prescritos para CCS moderada e severa podendo ser associado a outras terapias<sup>(4-8,20)</sup>. A posologia atualmente utilizada consiste de duas administrações diárias. Desta forma, os sistemas de liberação prolongada podem reduzir o intervalo de aplicações da CsA<sup>(6,21)</sup>.

No presente trabalho, o potencial de utilização de filmes de quitosana com propriedades mucoadesivas visando à liberação prolongada de CsA foi avaliado. Observou-se o aumento da produção de lágrimas no OD dos coelhos hígidos que receberam o filme mucoadesivo em comparação ao olho contralateral, ou seja, o olho controle. Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Toshida e colaboradores<sup>(22)</sup>, em que se observou um aumento na produção de lágrimas nos olhos de coelhos normais tratados com CsA. Entretanto, neste estudo não houve aumento da secreção lacrimal nos animais que tiveram os olhos desnevrados, sugerindo que o fármaco estimula o reflexo de lacrimejar. Em outro trabalho, foi observado que a CsA, além de aumentar a produção de lágrimas, foi capaz de reduzir a intensidade da ceratoconjuntivite em animais induzidos com dacrioadenite autoimune<sup>(23)</sup>.

No estudo realizado por De Campos et al.<sup>(16)</sup>, a CsA foi identificada na córnea e conjuntiva de coelhos após 48h da ad-

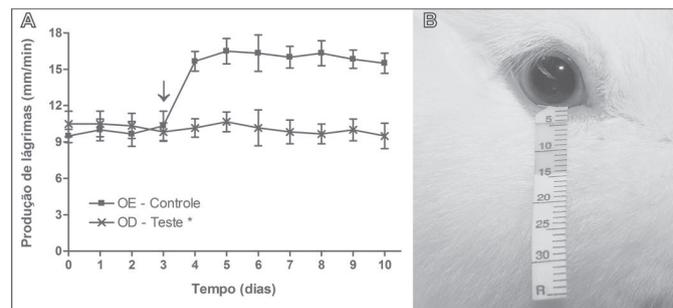


Figura 2: A: Média da produção de lágrimas (mm/min), utilizando o teste lacrimal de Schirmer, nos olhos que receberam o filme de quitosana contendo ciclosporina em comparação com olhos controle (OD - olho direito; OE - olho esquerdo); A seta indica o momento em que o filme foi aplicado nos olhos dos animais. Os valores são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística da diferença foi determinada pelo teste *t* de Student não pareado; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle após o 3º dia de avaliação; B: Fotografia de olho de coelho após o teste lacrimal de Schirmer evidenciando o aumento na produção de lágrimas

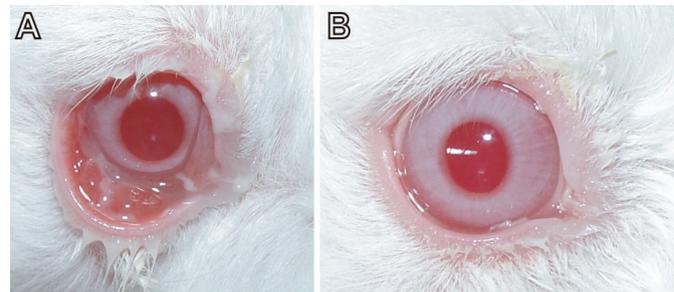


Figura 3: A: Fotografia de olho de coelho evidenciando hiperemia da mucosa palpebral e lacrimejamento; B: Fotografia de olho de coelho com lacrimejamento

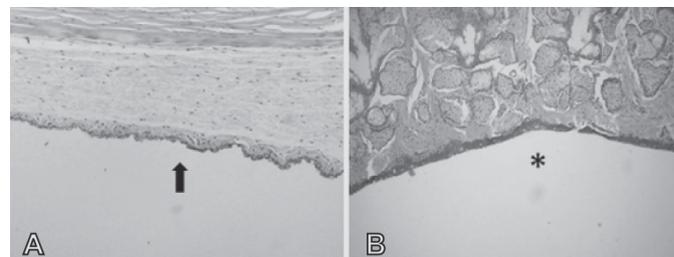


Figura 4: A: Fotomicrografia de conjuntiva bulbar de coelho; notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes (seta) HE. 25x. B: Fotomicrografia de pálpebra de coelho; notar ausência de alterações significativas no epitélio e estruturas adjacentes (asterisco) HE. 25x

ministração de nanopartículas de quitosana. Esta concentração foi significativamente mais elevada em comparação com os animais que receberam solução e suspensão contendo CsA. Não foram identificados sinais da droga nas estruturas intraoculares e no plasma. Estes promissores resultados criam expectativas no desenvolvimento de implantes com liberação local de drogas minimizando a absorção sistêmica e, consequentemente, os efeitos adversos. Neste trabalho, a liberação da ciclosporina foi determinada a partir do seu efeito farmacodinâmico, em que se observou uma correlação direta entre a liberação da CsA na superfície ocular e o aumento da secreção de lágrimas.

O processo de adesão do filme à mucosa ocular é importante não só para garantir uma liberação prolongada da droga, mas também para a manutenção da integridade da córnea. A ausência

de correta adesão pode causar ceratite ulcerativa como também comprometer a terapêutica. O sistema desenvolvido, aplicado no saco conjuntival de coelhos normais após anestesia tópica, permaneceu aderido na mucosa durante todo o período do estudo. A facilidade de aplicação, pela simples tração cranial da pálpebra inferior expondo o saco conjuntival, sem a necessidade de contenção física ou farmacológica, constitui uma vantagem do sistema desenvolvido e viabiliza sua utilização clínica. Após administração do filme, os coelhos permaneceram tranqüilos e não foi necessária nenhuma proteção para prurido e automutilação.

Durante o período de permanência dos filmes de quitosana em contato com tecidos oculares, observou-se ausência de anormalidades oculares ao exame oftalmológico, o que foi confirmado pela avaliação histológica onde não foram identificadas alterações significativas. Em recente estudo, o mesmo tipo de sistema à base de quitosana contendo timolol permaneceu em contato com a mucosa conjuntival por um período de 10 semanas e não observou o aumento na produção de lágrimas por meio do TLS nem tampouco alterações significativas<sup>(18)</sup>. É sabido que a presença de corpo estranho na superfície ocular pode provocar lacrimejamento reflexo devido ao processo irritativo. Entretanto, sugere-se que o lacrimejamento observado nos animais está diretamente relacionado ao aumento da produção de lágrimas promovido pela CsA liberada dos filmes de quitosana que superou a capacidade de drenagem do sistema lacrimal, já que o ducto nasolacrimal não apresentava obstruções. Não foram identificadas anormalidades oculares ao exame oftalmológico e no estudo histopatológico que justificariam a ocorrência de lacrimejamento por algum efeito indesejável do sistema ou da droga.

Para futura aplicação destes sistemas desenvolvimentos na clínica oftalmológica, mais estudos ainda serão realizados, tais como a avaliação da biodisponibilidade da droga nos tecidos oculares, a farmacocinética de distribuição e eliminação da droga e também estudos de toxicidade ocular que comprovem os resultados encontrados até o momento.

## CONCLUSÃO

Os filmes de quitosana contendo CsA parecem provocar efeitos positivos no aumento da produção de lágrimas e, através do exame macroscópico e histológico, não provocaram efeitos deletérios demonstráveis na mucosa ocular. Estes sistemas apresentam a possibilidade de redução do número de aplicações diárias de drogas e possivelmente um tratamento mais efetivo para CCS. Mais estudos são necessários para confirmar o potencial de utilização destes sistemas e sua aplicação clínica no tratamento de diferentes doenças oculares.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Aksungur P, Demirbilek M, Denkbaz EB, Vandervoort J, Ludwig A, Unlü N. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *J Control Release*. 2011;151(3):286-94.
2. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol*. 2002;133(2): 181-6.

3. Schein OD, Muñoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K, West S. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol*. 1997; 124(6):723-8.
4. Behrens A, Doyle JJ, Stern L, Chuck RS, McDonnell PJ, Azar DT, Dua HS, Hom M, Karpecki PM, Laibson PR, Lemp MA, Meisler DM, Del Castillo JM, O'Brien TP, Pflugfelder SC, Rolando M, Schein OD, Seitz B, Tseng SC, van Setten G, Wilson SE, Yiu SC; Dysfunctional tear syndrome study group. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea*. 2006;25(8):900-7. Comment in *Cornea*. 2007;26(7):901.
5. Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(6 Suppl):89-95. Review.
6. Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonis VF, Siganos C. Treatment of chronic dry eye: focus on cyclosporine. *Clin Ophthalmol*. 2008;2(4):829-36.
7. Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith JA, Gipson IK. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol*. 2000; 118(11):1489-96.
8. Turner K, Pflugfelder SC, Ji Z, Feuer WJ, Stern M, Reis BL. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea*. 2000;19(4):492-6.
9. Pflugfelder SC, De Paiva CS, Villarreal AL, Stern ME. Effects of sequential artificial tear and cyclosporine emulsion therapy on conjunctival goblet cell density and transforming growth factor-beta2 production. *Cornea*. 2008;27(1):64-9.
10. Coster DJ, Shepherd WF, Fook TC, Rice NS, Jones BR. Prolonged survival of corneal allografts in rabbits treated with cyclosporin A. *Lancet*. 1979;2(8144):688-9.
11. Utine CA, Stern M, Akpek EK. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A. *Ocul Immunol Inflamm*. 2010;18(5):352-61.
12. Peng CC, Chauhan A. Extended cyclosporine delivery by silicone-hydrogel contact lenses. *J Control Release*. 2011;154(3): 267-74.
13. Alonso MJ, Sánchez A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55(11):1451-63.
14. Kimura H, Ogura Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica*. 2001;215(3):143-55.
15. Alpar HO, Groves MJ. Vaccines: ancient medicines to modern therapeutics. In: Groves MJ, editor. *Pharmaceutical biotechnology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 307-32.
16. De Campos AM, Sánchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporine A. *Int J Pharm*. 2001;224(1-2):159-68.
17. Sandri G, Bonferoni MC, Gökçe EH, Ferrari F, Rossi S, Patrini M, et al. Chitosan-associated SLN: in vitro and ex vivo characterization of cyclosporine A loaded ophthalmic systems. *J Microencapsul*. 2010;27(8):735-46.
18. Fulgêncio GO, Viana FA, Ribeiro RR, Yoshida MI, Faraco AG, Cunha-Júnior Ada S. New mucoadhesive chitosan film for ophthalmic drug delivery of timolol maleate: in vivo evaluation. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2012;28(4):350-8.
19. Fialho SL, Cunha-Júnior AS. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2004;32(6):626-32.
20. Jackson MA, Burrell K, Gaddie IB, Richardson SD. Efficacy of a new prescription-only medical food supplement in alleviating signs and symptoms of dry eye, with or without concomitant cyclosporine A. *Clin Ophthalmol*. 2011;5:1201-6.
21. Dastjerdi MH, Hamrah P, Dana R. High-frequency topical cyclosporine 0.05% in the treatment of severe dry eye refractory to twice-daily regimen. *Cornea*. 2009;28(10):1091-6.
22. Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, Murakami A. Neurologic evaluation of acute lacrimomimetic effect of cyclosporine in an experimental rabbit dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(6):2736-41.
23. Thomas PB, Samant DM, Zhu Z, Selvam S, Stevenson D, Wang Y, et al. Long-term topical cyclosporine treatment improves tear production and reduces keratoconjunctivitis in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2009;25(3):285-92.

## Autor correspondente

Avenida Antônio Carlos, nº 6627 – Pampulha  
CEP 31270-901 – Belo Horizonte (MG), Brasil  
Tel: 55 (31) 3409-6949 – Fax: 55 (31) 3409-6753  
e-mail: armando@ufmg.br