

Liberação intraocular de ofloxacin associada a lente de contato biossintética em ceratite bacteriana experimental em cães

[*Introcular release of ofloxacin associated with biosynthetic contact lens in experimental bacterial keratitis in dogs*]

D.N. Cremonini¹, J.J.T. Ranzani², M.L.R.S. Cunha², F.G. Tonin³, C.V.S. Brandão², Y. Messadeq⁴

¹Médica Veterinária – São Paulo, SP

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu, SP

³Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais – Botucatu, SP

⁴Instituto de Química - UNESP – Araraquara, SP

RESUMO

Avaliou-se a concentração de ofloxacin liberada por uma lente de contato de membrana de celulose biossintética, para tratamento de ceratite bacteriana experimental em cães, pela inoculação de *Staphylococcus aureus* intraestromal. Comparou-se o tratamento com a lente de contato biossintética impregnada com ofloxacin à terapia tópica convencional. Realizou-se avaliação microbiológica e dosagem de ofloxacin no humor aquoso por meio do método de cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC). Houve diferença estatística na contagem de colônias bacterianas entre os olhos com ceratite e os demais grupos, no primeiro dia de coleta. O biomaterial, impregnado com ofloxacin, promoveu liberação gradual durante o período de avaliação, aos três e sete dias; no terceiro dia, o grupo tratado com a lente de contato obteve mediana de 3,72µg/mL, enquanto o grupo tratado com colírio resultou em 49,56µg/mL. Apesar do valor inferior, o grupo com lente de contato atingiu a concentração inibitória mínima, sendo eficaz no controle da infecção bacteriana.

Palavras-chave: cão, ceratite bacteriana, membrana biossintética, ofloxacin, HPLC

ABSTRACT

The concentration of ofloxacin released by contact lens made of biosynthetic cellulose membrane was evaluated for the treatment of experimental bacterial keratitis in dogs by intrastromal inoculation of Staphylococcus aureus. The biosynthetic contact lens impregnated with ofloxacin was compared with the conventional topical therapy. The microbiological evaluation and the determination of ofloxacin in aqueous humor were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). There was not statistical difference in the counting of bacterial colonies among the eyes with keratitis and other groups, on the first day of collection. The biomaterial, impregnated with ofloxacin, promoted gradual release during the evaluation period, at three and seven days; on the third day, the group treated with the contact lens obtained a median of 3.72µg/mL, while the group treated with eye drops resulted in 49.56µg/mL. Despite the lower value, the group with contact lens reached the minimum inhibitory concentration, which was effective in controlling the bacterial infection.

Keywords: dog, bacterial keratitis, biosynthetic membrane, ofloxacin, HPLC

INTRODUÇÃO

A córnea apresenta muitos mecanismos de defesa, imunogênicos e não imunogênicos, que a protegem contra agentes infecciosos, devido ao contato constante com microrganismos presentes no ambiente. A maioria das infecções corneanas

causadas por bactérias ocorre após traumatismo corneano ou em casos de alterações do mecanismo de defesa local ou sistêmica (Lima e Belfort Jr., 1997). A ceratite ulcerativa é caracterizada por processos erosivos superficiais ou profundos na córnea com perda de epitélio e exposição do estroma. Entre as ceratites

Recebido em 27 de outubro de 2009

Aceito em 30 de julho de 2010

E-mail: danidelete@yahoo.com.br

infeciosas, a bacteriana é a mais frequente, sendo, em algumas situações, difícil distingui-la de outras doenças inflamatórias e infecciosas da córnea. O tratamento visa eliminar rapidamente os microrganismos, reduzir a resposta inflamatória, prevenir o dano estrutural e promover a cicatrização corneana (Alves et al., 2006).

As lentes de contato terapêuticas são utilizadas para auxiliar o processo de reparação corneana, incluindo alívio da dor, manutenção da aposição do epitélio cicatrizado ao estroma e proteção ao crescimento do novo epitélio (Kanpolat e Uçakhan, 2003). As lentes de contato de hidrogel são também utilizadas com vetor de liberação de diversas substâncias na superfície ocular, aumentando o tempo de permanência e a concentração do medicamento tópico (Wajs e Meslard, 1986).

Estudada desde a década de 60, a bactéria gram-negativa *Acetobacter xylinum* possui a característica de sintetizar um material semelhante à celulose, porém de origem animal (Carson et al., 1967). Esta membrana de celulose possui características biossintéticas que a tornam inerte, atóxica e seletivamente permeável, agindo como uma barreira aos microrganismos (Gattaz Sobrinho, 1989); possui estrutura semelhante à derme, possibilitando seu uso como substituto a ela em diversas lesões, reduzindo a dor e auxiliando o processo cicatricial. A membrana possui boa aceitação pelo organismo, protegendo e auxiliando a cicatrização de áreas lesadas, além de impedir a contaminação de microrganismos, por permeabilidade seletiva, podendo ainda ser impregnada com antimicrobiano para liberação gradual (Rebello et al., 1987; Markman et al., 1995).

Propôs-se, portanto, a utilização desta membrana de celulose, aplicada como uma lente de contato, para liberação de antimicrobiano, no tratamento de ceratite bacteriana experimental em cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os critérios utilizados seguiram as normas para experimentação animal e foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu.

As lentes foram confeccionadas a partir de uma membrana de celulose bacteriana (Fibrocel Prod. Biotecnológicos, Brasil), produzida em meio enriquecido para crescimento, mantido durante 72 horas até obter-se uma manta de 10mm de espessura. A celulose foi embebida em solução tampão, para atingir pH 7. Após secagem em estufa, obteve-se uma membrana desidratada de 0,5mm de espessura. A lente de contato foi confeccionada em forma de teflon, com raio de curvatura de 8,5mm e diâmetro de 16mm. Em seguida, a lente foi esterilizada por radiação gama e embebida em solução de ofloxacina a 0,3% (Alcon, Brasil), durante 24 horas, para impregnação com o antibiótico, atingindo espessura média de 0,7mm.

Foram utilizados 32 olhos de cães hípidos, sem raça definida, adultos, machos e fêmeas, com peso entre 10 e 20kg. Os cães foram distribuídos em quatro grupos, em que induziu-se ceratite em 16 olhos. Oito olhos foram tratados com colírio de ofloxacina 0,3% (GrC) e oito com a lente de contato biossintética (LCB) impregnada com ofloxacina 0,3% (GrCL), durante sete dias. Quanto aos demais olhos, oito receberam apenas a LCB impregnada (GrL) e oito compuseram o grupo-controle (GrN).

Para produzir ceratite nos animais estudados, foi utilizada uma linhagem com padrão internacional de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, previamente descrita como causadora de ceratite em coelhos e analisada em tratamento experimental de ceratite bacteriana (Moreau et al., 2002).

Os animais foram tranquilizados com 0,1mg/kg de acepromazina (Acepran - Univet, Brasil) e 1mg/kg de cloridrato de tramadol (Tramal - Searle, Brasil), via intramuscular e, após 10 minutos, anestesiados com 15mg/kg de cetamina (Dopalen - Agribands, Brasil) associada a 2mg/kg de xilazina (Dopaser - Calier, Espanha) e 1mg/kg de diazepam (União Química, Brasil), via intravenosa. Procedeu-se à antisepsia da superfície ocular com solução de iodo povidine a 5%, diluído em solução fisiológica. A córnea foi dessensibilizada com colírio de proximetacafina (Anestalcon - Alcon, Brasil) 0,5%. Realizou-se uma incisão de 0,5mm de profundidade e 2,5mm de comprimento com bisturi 15° de profundidade limitada (Groove Blade - Feather Safety Razor, Japão) na região central da córnea; em seguida, a

camada estromal média foi incisada, paralela às lamelas, com bisturi crescente angulado (Tunnel Scalpel - Feather Safety Razor, Japão), de modo a formar um túnel, onde foi inoculado 0,1mL de cultivo bacteriano com 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Fig. 1). Ambos os tratamentos foram iniciados 24 horas após a indução da ceratite e mantidos durante sete dias. Nos olhos pertencentes ao grupo tratado com a lente de contato, esta foi posicionada instilando-se colírio de proparacaína para dessensibilização da córnea. Nos olhos referentes ao grupo tratado com colírio, instilou-se ofloxacina 0,3% (Alcon, Brasil), quatro vezes ao dia. Em todos os animais tratados, foi instilado colírio de atropina 1% (Allergan, Brasil) a cada 24 horas durante sete dias, para controle do espasmo da musculatura ciliar e alívio da dor.

No momento imediatamente anterior ao início do tratamento e posteriormente, em intervalos de 24 horas, realizou-se coleta de secreção conjuntival com suabe em todos os olhos, até a cultura apresentar-se negativa. O suabe conjuntival foi semeado, para cultivo microbiológico, em placa de agar sangue e caldo BHI, em incubação a 37°C, para se observar crescimento de colônias e turvação, respectivamente, sendo avaliado a cada 24h. A colheita de humor aquoso para análise farmacológica foi realizada no terceiro e sétimo dias de avaliação. Os animais foram anestesiados com 10mg/kg via intravenosa pela associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil - Virbac, Brasil), e com proparacaína tópica, para punção de câmara anterior e colheita de 0,2mL de humor aquoso, com agulha de 13x0,45mm e seringa de 1mL; após aspiração, introduziu-se uma bolha de ar, de mesmo volume, para manter a pressão da câmara anterior. O humor aquoso foi acondicionado em microtubo estéril e mantido em congelador a -80°C até o momento da análise farmacológica. A concentração do antibiótico foi analisada de forma quantitativa, pelo sistema Shimadzu (Shimadzu, Japão) de cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) e software para aquisição e tratamento de dados LC Solution versão 1.22 SP1.

Foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis para comparação entre grupos, em cada momento de avaliação e o teste de

Friedman para comparação entre os momentos. Os testes, para todas as variáveis relativas às observações clínicas e histopatológicas, foram realizados a 5% de significância (Zar, 1999).

RESULTADOS

Nos olhos com ceratite (Fig. 2) e aplicação de lente de contato biossintética (LCB), apenas uma amostra de secreção conjuntival não apresentou crescimento bacteriano, no primeiro dia de coleta; nove resultaram em alta quantidade de colônias (acima de 300UFC) e sete tiveram crescimento limitado. Nos dias subsequentes, a contagem de colônia reduziu intensamente até não se obter crescimento no quarto dia, em todos os olhos. Quanto aos olhos sem ceratite, a contagem foi próxima a zero. Houve diferença estatística entre os grupos com ceratite (GrCL e GrC) e os grupos sem indução da lesão (GrL e GrN), no primeiro dia de avaliação e entre os demais dias.

As amostras de humor aquoso foram analisadas pelo método de cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) e obtiveram-se os valores da Tab. 1. Algumas amostras apresentaram alta densidade devido à presença de fibrina e não foi possível o processo de leitura pelo equipamento. Os resultados avaliados foram superiores no grupo com ceratite, tratados com colírio de ofloxacina 0,3%, comparados aos que receberam a lente impregnada, no terceiro dia, em todos os olhos. No sétimo dia, as amostras do grupo ceratite (GrC) demonstraram valores menores, comparados à leitura anterior e, no grupo ceratite e LCB (GrCL), apenas dois resultaram positivos. As dosagens dos olhos do GrCL foram maiores que as do grupo com lente (GrL), detectadas em apenas duas amostras. As análises do grupo controle (GrN) não mostraram a presença de ofloxacina, tanto no terceiro quanto no sétimo dias.

No terceiro dia, ocorreu diferença estatística entre GrC e GrCL e entre estes comparados aos demais grupos e não houve diferença entre GrL e GrN. No sétimo dia, houve diferença estatística entre GrC e os demais grupos. Não houve diferença entre GrCL, GrL e GrN.

Tabela 1. Valores de concentração da ofloxacina no humor aquoso ($\mu\text{g/mL}$), em olhos de cães com ceratite bacteriana e grupo-controle, segundo grupos e momentos, coletada no terceiro (M3) e sétimo (M7) dias de avaliação

Olhos	GrCL		GrC		GrL		GrN	
	M3	M7	M3	M7	M3	M7	M3	M7
1	1,69	0	18,93	6,16	0	0	0	0
2	3,18	0	*	6,32	0	0	0	0
3	3,72	0	31,62	7,83	0	0	0	0
4	4,81	0	159,74	15,18	0	0	0	0
5	1,87	0	49,56	7,17	0	0	0	0
6	*	0	63,71	6,06	*	2,54	0	0
7	4,88	5,35	59,17	6,65	*	*	0	0
8	11,76	3,96	37,51	4,06	0	4,2	0	0
mediana	3,72	0	49,56	6,49	0	0	0	0

GrCL: grupo ceratite+lente; GrC: grupo ceratite; GrL: grupo lente; GrN: grupo normal

* material não avaliado devido à presença de fibrina

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As fluorquinolonas são potentes agentes antimicrobianos com amplo espectro de ação e intensa atividade contra organismos gram-negativos e gram-positivos. Ofloxacina e ciprofloxacina são duas das mais comumente utilizadas no tratamento de infecções oftálmicas (Prajna et al., 2001), além de a ofloxacina apresentar maior absorção intra-ocular, tanto no epitélio íntegro quanto lesado, indicando relevância em sua escolha como antibiótico adotado na terapia da ceratite bacteriana empregada neste estudo (Ghazi-Nouri et al., 2003; Healy et al., 2004; Yu-Speight et al., 2005). Adotou-se a frequência de instilação do antibiótico de quatro vezes ao dia para evitar a indução de bactérias resistentes (Mutton et al., 1997; Dowling e Grahn, 1998). Optou-se, ainda, pela associação da atropina 1% tópica devido à possibilidade de ocorrência de iridociclite reflexa, que acompanha as úlceras corneanas (Kern, 2004).

Os olhos, nos quais houve indução da ceratite bacteriana, apresentaram alto crescimento de colônias nas placas semeadas com a secreção conjuntival no primeiro dia, reduzindo intensamente a contagem nos demais. Os suabes foram mantidos em caldo de enriquecimento, detectando-se turvação após 24 horas, fato que indica presença de bactérias no material colhido, porém em quantidade insuficiente para crescimento na placa semeada. Estes resultados demonstraram a eficácia no tratamento das ceratites, tanto no grupo tratado com colírio quanto com a lente impregnada. Nos grupos sem

ceratite, houve baixa contagem em todas as colheitas, nas quais cresceram apenas bactérias presentes na microbiota normal, visto que *S. aureus* pode estar presente de forma não patogênica (Dajcs et al., 2001).

Quanto à concentração da ofloxacina detectada nas amostras de humor aquoso na primeira coleta, ao terceiro dia, os grupos GrC e GrCL mostraram valores acima da concentração inibitória mínima de $0,57\mu\text{g/mL}$, para *S. aureus* (Barequet et al., 2004), embora as doses do GrCL tenham sido menores. Pela análise microbiológica, houve resposta favorável ao antibiótico, indicando, também, que a liberação gradual foi constante e suficiente para atingir a concentração terapêutica. Na segunda coleta, ao sétimo dia, apenas o GrC se diferenciou dos demais, mas com valores menores que na primeira coleta. Essa diferença ocorreu devido à ausência de lesão corneana, o que dificulta a passagem de substâncias quando a barreira epitelial está intacta (Healy et al., 2004; Yu-Speight et al., 2005). O mesmo fator pode ser considerado, quando comparados os valores obtidos com outros dados de coleta de humor aquoso em córneas íntegras de cães, onde se obteve valores entre 0,4 e $2,8\mu\text{g/mL}$ (Yu-Speight et al., 2005). No GrL, tanto a primeira quanto a terceira coleta apresentaram baixos níveis de antibiótico, provavelmente devido à presença desta barreira, associada ao baixo nível de antibiótico ao sétimo dia. Em humanos, as LCT são contraindicadas em infecções ativas, pois a infecção pode ser exacerbada, entretanto, nas avaliações relacionadas ao projeto, não ocorreu piora do quadro infeccioso, ao contrário, houve

Liberção intraocular de ofloxacina...

redução do crescimento bacteriano, conforme resultados obtidos nos cultivos microbiológicos (Nilsson e Montana, 1994).

Além das características protetoras e cicatrizantes, segundo Markman et al. (1995), a membrana pode ainda ser impregnada com antimicrobiano. Esses autores demonstraram a liberação gradual de tetraciclina, em concentrações decrescentes durante 12 dias, após

o implante de discos embebidos no peritônio de camundongos.

Conclui-se que a LCB promoveu liberação gradual de ofloxacina, em concentração adequada, até o terceiro dia de avaliação, apresentando efeito antimicrobiano, apesar de a concentração do antibiótico ser menor que no grupo tratado com colírio.

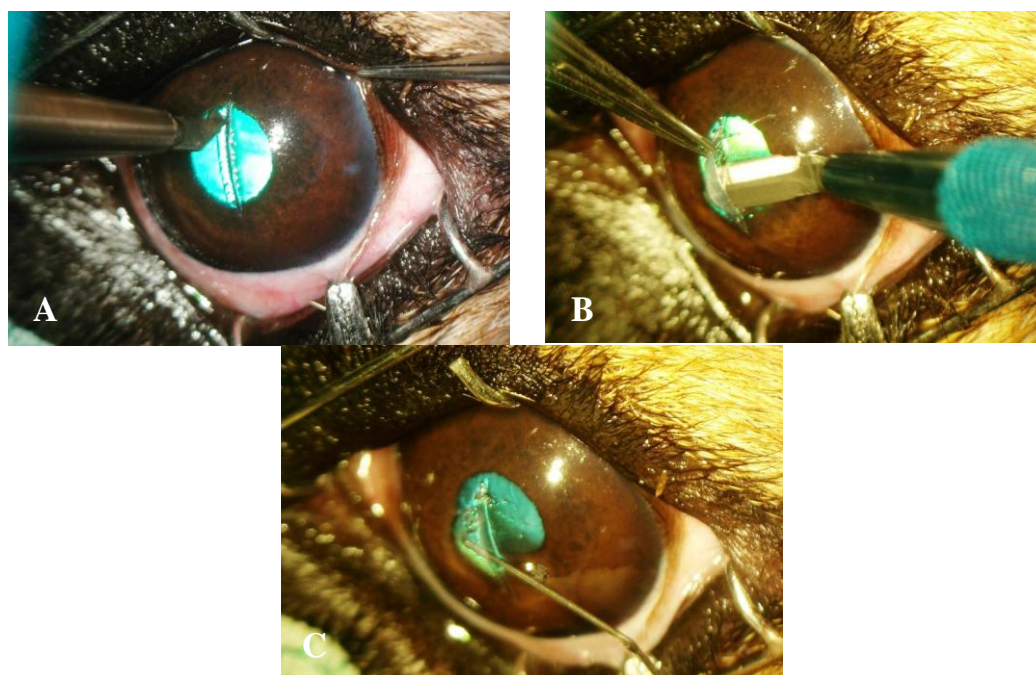


Figura 1. Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico de indução da ceratite bacteriana por inoculação intraestromal de *Staphylococcus aureus* em olho de cão. **A:** incisão com bisturi de profundidade limitada de 0,5mm; **B:** formação de túnel lamelar com bisturi crescente angulado; **C:** inoculação da suspensão bacteriana contendo 10^8 UFC em 0,1mL.

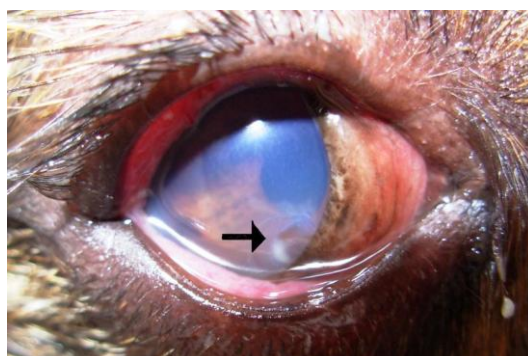


Figura 2. Imagem fotográfica do olho de cão do grupo ceratite (GrC), no primeiro dia de avaliação após a indução da ceratite. Nota-se exposição da terceira pálpebra devido à dor, hiperemia conjuntival e lesão corneana (seta).

AGRADECIMENTO

À FAPESP, pela concessão de bolsa de pesquisa, processo nº 04/06736-0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.R.; CRESTA, F.B.; ANDRADE, B.B.A. et al. Alterações da superfície ocular por infecções. In:____. *Superfície ocular*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. cap.12, p.167-202.
- BAREQUET, I.S.; DENTON, P.; OSTERHOUT, G.J. et al. Treatment of experimental bacterial keratitis with topical trovafloxacin. *Arch. Ophthalmol.*, v.122, p.65-69, 2004.
- CARSON, J.H.; SOWDEN, L.C.; COLVIN, J.R. The induction of birefringence in pellicles of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* by lipids. *Can. J. Microbiol.*, v.13, p.837-844, 1967.
- DAJCS, J.J.; MOREAU, J.M.; THIBODEAUX, B.A. et al. Effectiveness of ciprofloxacin and ofloxacin in a prophylaxis model of *Staphylococcus* keratitis. *Cornea*, v.20, p.878-880, 2001.
- DOWLING, P.M.; GRAHN, B.H. Antimicrobial therapy of ocular infections. *Can. Vet. J.*, v.39, p.121-124, 1998.
- GATTAZ SOBRINHO, A. Uma película celulósica no tratamento das queimaduras do II e III graus. *Rev. Bras. Cir.*, v.79, p.45-51, 1989.
- GHAZI-NOURI, S.M.; LOCHHEAD, J.; MEARZA, A.A. et al. Penetration of oral and topical ciprofloxacin into the aqueous humor. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, v.31, p.40-43, 2003.
- HEALY, D.P.; HOLLAND, E.J.; NORDLUND, M.L. et al. Concentrations of levofloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin in human corneal stromal tissue and aqueous humor after topical administration. *Cornea*, v.23, p.255-263, 2004.
- KANPOLAT, A.; UÇAKHAN, O.O. Therapeutic use of focus night & day contact lenses. *Cornea*, v.22, p.726-734, 2003.
- KERN, T.J. Antibacterial agents for ocular therapeutics. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, v.34, p.655-668, 2004.
- LIMA, A.L.H.; BELFORT Jr., R. Ceratites bacterianas. In: BELFORT Jr., R.; KARA-JOSÉ, N. (Eds). *Córnea clínica-cirúrgica*. São Paulo: Roca, 1997, cap.18, p.181-188.
- MARKMAN, C.; FRACALANZZA, S.E.L.; NOVAES Jr., A.B. et al. Slow release of tetracycline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration. *J. Periodontol.*, v.66, p.978-983, 1995.
- MOREAU, J.M.; CONERLY, L.L.; HUME, E.B.H. et al. Effectiveness of mupirocin and polymyxin B in experimental *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* keratitis. *Cornea*, v.21, p.807-811, 2002.
- MUTTON, F.L.; KAKINOWANA, E.; ALVES, M.R. et al. Considerações sobre o tratamento de úlceras corneanas presumivelmente bacterianas. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.60, p.258-261, 1997.
- NILSSON, S.; MONTANA, P.G. The annualized incidence of contact lens induced keratitis in Sweden and its relation to lens type and wear schedule: results of a three-month prospective study. *CLAO J.*, v.20, p.225-230, 1994.
- PRAJNA, N.V.; GEORGE, C.; SELVARAJ, S. et al. Bacteriologic and clinical efficacy of ofloxacin 0,3% versus ciprofloxacin 0,3% ophthalmic solutions in the treatment of patients with culture-positive bacterial keratitis. *Cornea*, v.20, p.175-178, 2001.
- REBELLO, C.; ALMEIDA, D.A.; LIMA Jr., E.M. et al. Biofill um novo substituto de pele. *Rev. Bras. Cir.*, v.77, p.407-414, 1987.
- WAJS, G.; MESLARD, J.C. Release of therapeutic agents from contact lenses. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v.2, p.275-289, 1986.
- YU-SPEIGHT, A.W.; KERN, T.J.; ERB, H.N. Ciprofloxacin and ofloxacin aqueous humor concentrations after topical administration in dogs undergoing cataract surgery. *Vet. Ophthalmol.*, v.8, p.181-187, 2005.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663p.