UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
FACULDADE DE FARMÁCIA (FF)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
(PPGNanoFarma)

MARIA CAROLINA ANDRADE GUERRA

Dispositivo de liberação intravítrea para tratamento de degeneração macular relacionada à idade

BELO HORIZONTE
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[ ] Dissertação [X] Tese [ ] Outro*:_____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

MARIA CAROLINA ANDRADE GUERRA

3. Título do trabalho

DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO INTRAVÍTREA PARA TRATAMENTO DE DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior**, **Usuário Externo**, em 20/04/2023, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Maria Carolina Andrade Guerra**, **Discente**, em 20/04/2023, às 09:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3687689** e o código CRC **54F5C96D**.

Referência: Processo nº 23070.013889/2023-61 SEI nº 3687689

MARIA CAROLINA ANDRADE GUERRA

Dispositivo de liberação intravítrea para tratamento de degeneração macular relacionada à idade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Associação em Rede de IES, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Nanotecnologia Farmacêutica.
Área de concentração: Nanotecnologia Aplicada às Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – Fafar/UFMG

Coorientadora: Dra. Sílvia Ligório Fialho, Fundação Ezequiel Dias – FUNED/MG

BELO HORIZONTE
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Guerra, Maria Carolina Andrade
Dispositivo de liberação intravítrea para tratamento de degeneração macular relacionada à idade [manuscrito] / Maria Carolina Andrade Guerra. - 2023.
99 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Armando Silva-Cunha; co-orientadora Dra. Sílvia Ligório Fialho.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Goiânia, 2023.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. degeneração macular relacionada à idade. 2. nanofibras. 3. implante biodegradável. 4. aplicação intravítrea. 5. bevacizumabe. I. Silva-Cunha, Armando , orient. II. Título.

CDU 615.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 06 da sessão de Defesa de Tese de **MARIA CAROLINA ANDRADE GUERRA** que confere o título de Doutora em Nanotecnologia Farmacêutica, na área de concentração em Nanotecnologia Aplicada às Ciências Farmacêuticas.

Aos quatro dias do mês de abril de dois mil e vinte e três, a partir das 09:30 horas, Auditório da Diretoria de Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias - FUNED, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "**DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO INTRAVÍTREA PARA TRATAMENTO DE DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE**". Os trabalhos foram instalados pelo Presidente da banca, **Professor Doutor Armando da Silva Cunha Júnior (UFMG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professora Doutora Eliana Martins Lima (FF/UFG); Doutora Sílvia Ligório Fialho (Fundação Ezequiel Dias - FUNED); Doutora Lays Fernanda Nunes Dourado (Fundação Ezequiel Dias - FUNED); Doutora Marina França Dias (Fundação Ezequiel Dias - FUNED)**. Durante a arguição os membros da banca discutiram com a candidata diversos aspectos do trabalho de tese, fundamentos teóricos, resultados e conclusões e não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamado o resultado pelo **Professor Doutor Armando da Silva Cunha Júnior (UFMG)**, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos quatro dias do mês de abril de dois mil e vinte e três.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Documento assinado eletronicamente por **Eliana Martins Lima**, **Professor do Magistério Superior**, em 24/04/2023, às 07:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior**, **Usuário Externo**, em 24/04/2023, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Lays Fernanda Nunes Dourado**, **Usuário Externo**, em 24/04/2023, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Silvia Ligorio Fialho**, **Usuário Externo**, em 24/04/2023, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Marina França Dias**, **Usuário Externo**, em 24/04/2023, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3691922** e o código CRC **EFD3F7AD**.

Referência: Processo nº 23070.013889/2023-61 SEI nº 3691922

Dedico este trabalho
aos meus companheiros de aventuras:
Billy e Raul.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, pela oportunidade, confiança e amizade.

À Dra. Silvia Ligório Fialho pela motivação, convivência diária, pelo exemplo de profissional e amizade.

Minha gratidão eterna a vocês por acreditarem em mim, muito mais do que eu mesma. E por terem me proporcionado uma das melhores experiências da minha vida por meio da ciência.

Ao Ricardo Santiago Ferreira, amor da minha vida, por acreditar e me apoiar de forma amorosa e incondicional durante toda trajetória.

Aos meus queridos pais e meus sogros, que são também como pais para mim, pelo apoio e carinho ao longo da vida.

Ao Guto, que com toda sua criatividade, conhecimento e disponibilidade me ajudou na montagem das várias versões do Jerry, nossos dispositivos para revestimento.

A todos do Serviço de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico da FUNED, em especial à Celda e Carol Moreira, por toda ajuda, convivência e amizade.

Ao Dr. Luiz Guilherme Heneine pela disponibilidade, confiança e positividade. Sou muita grata pelo conhecimento compartilhado, a sua colaboração foi essencial ao trabalho.

A equipe do Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápico da FUNED, em especial à Lívia e Leo Alan por estarem sempre disponíveis para fazer as análises de microscopia eletrônica.

Ao Thiago Xavier, Thamires Caroline, Julia Teixeira e Michelle Gouvea Gomes, pela disponibilidade e ajuda.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice, por disponibilizar o equipamento para eletrofiação do LEPCom/DEMET da UFMG. E à Sarah Lamas por se disponibilizar a ensinar a usá-lo.

À Brenda Castro pela importante companhia durante um ano na UCI. Sua amizade e convivência deixou a experiência do estágio sanduíche muito mais leve e divertida.

Aos colaboradores do laboratório BioTel, em UCI, Irvine/Califórnia, especialmente ao Professor Dr. Kwon pela oportunidade e confiança durante o doutorado sanduiche.

A Fernanda Bellato, da UFG, pela cordialidade e toda ajuda ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

A todos da Funed, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, FAPEMIG, INCT Nanofarma e ao PPGNanoFarma pela oportunidade de realizar esse trabalho.

RESUMO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença ocular crônica que causa danos à área central da retina. Está entre as principais causas de cegueira irreversível em adultos. O tratamento farmacológico de escolha utiliza injeções intravítreas de agentes anti-VEGF que ocasionalmente podem ser combinadas com corticosteróides. Injeções intravítreas são a via preferencial para administração de medicamentos ao segmento posterior do olho, porém apresentam sucesso terapêutico limitado devido à rápida eliminação de substâncias, exigindo injeções frequentes que podem trazer complicações ao paciente e baixa adesão ao tratamento. Implantes intravítreos são capazes de manter níveis terapêuticos de fármacos por um longo período. Nanofibras biodegradáveis podem modular a liberação de fármacos e permitir a incorporação de substâncias bioativas frágeis. O objetivo desse trabalho foi desenvolver implantes intravítreos biodegradáveis contendo dexametasona revestidos por nanofibras poliméricas contendo bevacizumabe como uma proposta terapêutica para o tratamento da DMRI. Os implantes nanorevestidos foram desenvolvidos. A caracterização do sistema, o estudo de degradação e eficiência do processo de revestimento foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura. O perfil de liberação dos fármacos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência e pelo método de Bradford. A atividade antiangiogênica foi determinada pelo modelo em membrana corioalantóica de embrião de galinha. A segurança da formulação foi avaliada em olhos de coelhos. O sistema foi desenvolvido com sucesso. O estudo de degradação demonstrou a presença de nanofibras na superfície do implante por até 35 dias. O perfil de liberação demonstrou que 68% da dexametasona foi liberada em 35 dias e 90% do bevacizumabe em 48h. A formulação apresentou atividade na redução de vasos e foi segura para a retina. Não foram observadas alterações clínica ou histopatológica, nem alteração na espessura da retina por tomografia ótica de coerência durante os 28 dias em que foi testado. Os implantes

desenvolvidos podem, portanto, serem considerados como uma nova alternativa para o tratamento da DMRI.

Palavras-Chave: Degeneração macular relacionada à idade, bevacizumabe, nanofibras, nanotecnologia, implante biodegradável, aplicação intravítrea.

ABSTRACT

Age-related macular degeneration, AMD, is a chronic eye disease which damages the macular area. It is the main cause of adult blindness worldwide. The pharmacological treatment of choice for the neovascular form of AMD consists of intravitreal injections of anti-VEGF agents that, occasionally, might be combined with corticosteroids. Intravitreal injections are the preferred route for drug delivery to the posterior segment of the eye but have limited therapeutic success due to the quick elimination of substances, requiring frequent injections that bring complications to the patient and low adherence to treatment. Intravitreal implants are capable to maintain therapeutic levels of drugs for a long period. Biodegradable nanofibers can modulate drug release in addition to allowing the incorporation of fragile bioactive substances. The present work aimed the development of biodegradable intravitreal implants containing dexamethasone coated with polymeric nanofibers containing bevacizumab as a therapeutic proposal for the treatment of AMD. Nanocoated implants were successfully developed. The characterization of the system, the study of degradation and efficiency of the coating process were evaluated by scanning electron microscopy. The drug release profile was determined by high performance liquid cromatography and the Bradford method. The antiangiogenic activity was determined by the chicken embryo chorioallantoic membrane model. The safety of the formulation was evaluated in rabbit eyes. So far, the system was successfully developed. The study degradation study confirmed the presence of nanofibers on the implant surface for up to 35 days. The degradation study demonstrated the presence of nanofibers on the surface of the implant for up to 35 days. The release profile showed that 68% of dexamethasone was released within 35 days and 90% of bevacizumab within 48 hours. The formulation presented activity in reducing vessels and was safe for the rabbits' retina. No clinical or histopathological changes were observed, neither alteration in retinal thickness by optical coherence tomography during the 28 days. The developed

implants, therefore, may be considered as a new alternative for the treatment of AMD.

Keywords: Age-related macular degeneration, bevacizumab, nanofibers, nanotechnology, biodegradable implant, intravitreal application.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia
CADTH	Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health
CAM	Membrana Corioalantóica (*chick embryo chorioallantoic membrane)*
CDTN	Centro de Desenvolvimento e Tecnologia Nuclear
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DPD	Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento
EMEA	*European Medicines Agency*
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ERG	Eletrorretinografia
FDA	*Food and Drug Administration*
Funed	Fundação Ezequiel Dias
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid cromatography)
I.Dexa	Implante PLGA contendo dexametasona
I.Dexa.Beva	Implante PLGA contendo dexametasona revestido por nanofibras de PVA contendo bevacizumabe
I.Dexa.Beva.PCL	Implante PLGA contendo dexametasona revestido por nanofibras de PVA contendo bevacizumabe revestido por nanofibras de PCL

IES	Instituto de Ensino Superior
LEPCom	Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MM	Massa Molecular
OCT	Tomografia de coerência ótica (Optical coerence tomography)
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PLGA	Ácido Poli-lático-co-glicólico
PPGNanoFarma	Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia Farmacêutica
PVA	Álcool Polivinílico
RPM	Rotação Por Minuto
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Vascular Endotelial Growth Fator)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da DMRI – Angiogênese. 3

Figura 2 - Principais estruturas oculares 12

Figura 3 - Vias de administração de fármacos mais empregadas para tratamento do segmento posterior. 13

Figura 4 - Esquema do processo de eletrofiação 17

Figura 5 - Equipamento de eletrofiação.....29

Figura 6 - A e B: Aparato disposto no aparelho de eletrofiação, C: Detalhes do aparato rotativo para revestimento dos implantes.....31

Figura 7 - Recipiente com sílica gel para armazenamento de implantes revestidos 32

Figura 8 - Implantes de cerca de 6 mm de comprimento, em estereomicroscópio com aumento 1,2x, (A) I.Dexa.Beva,, (B) I.Dexa, (C) I.Dexa.Beva.PCL, ...37

Figura 9 - Fotomicrografias dos implantes biodegradáveis intravítreos sem revestimento. (A) aumento de 85X e (B) aumento de 270X. 38

Figura 10 - Ultramicrografias dos implantes biodegradáveis intravítreos. (A) I.Dexa.Beva aumento de 30X, (B) I.Dexa.Beva superfície, aumento de 95X, (C) I.Dexa.Beva.PCL, aumento de 160X, (D) I.Dexa.Beva.PCL, corte transversal, aumento de 130X, (E) I.Dexa.Beva corte transversal, aumento de 230X, (F) I.Dexa.Beva.PCL, corte transversal, detalhe para visualização da camada de nanofibras aumento de 800X.....39

Figura 11 - Ultramicrografias da superfície do implante I.Dexa.Beva.PCL, presença de nanofibras de tamanhos diferentes (PCL e PVA).....40

Figura 12 - Imagens MEV das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe depositadas no coletor do aparelho de eletrofiação (A, B, C), aumento de 3000x. 42

Figura 13 - Histograma representativo do diâmetro das nanofibras contendo bevacizumabe, n=300. 43

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (aumento de 3000x) utilizadas para quantificação dos diâmetros das nanofibras contendo bevacizumabe da superfície do implante 44

Figura 15 - Histogramas representativos do diâmetro das nanofibras contendo bevacizumabe do revestimento do implante, n=300. 45

Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (aumento de 3000x) utilizadas para quantificação dos diâmetros das nanofibras de PCL 47

Figura 17 - Histogramas representativos do diâmetro das nanofibras de PCL no revestimento do implante, n=300. 48

Figura 18 - Fotomicografias de I.Dexa.Beva após 7 dias de estudo de degradação *in vitro* 50

Figura 19 - Fotomicrografias de I.Dexa.Beva.PCL durante estudo de degradação com aumentos de x30, x190, x3000 e x6000 em diferentes tempos: (A) 24 horas, (B) 72 horas, (C) 7 dias, (D) 14 dias, (E) 21 dias, (F) 28 dias, (G) 35 dias. 54

Figura 20 - Percentual de perda de massa dos implantes de PLGA revestidos com nanofibras (valores são representados com média + desvio padrão, n=3) 55

Figura 21 - Perfil de liberação *in vitro* (concentração x tempo) demonstrando o % acumulado de Dexametasona (n = 3). 57

Figura 22 - Perfil de liberação *in vitro* (concentração x tempo) demonstrando o % acumulado de Bevacizumabe (n = 3). 59

Figura 23 - Gel de eletroforese.....59

Figura 24 - Ovo no 7º dia de desenvolvimento embrionário com implante 63

Figura 25 - Avaliação da atividade antiangiogênica – Imagens representativas dos grupos estudados 67

Figura 26 - (A) % de área dos vasos no ensaio na CAM, (B) % de redução na área dos vasos 68

Figura 27 - Embriões com 10 dias, após ensaio na CAM. 71

Figura 28 - Protocolo esquemático do ensaio *in vivo*.....72

Figura 29 - Implantação na cavidade vítrea do coelho.....74

Figura 30 - Pressão intraocular dos grupos avaliados em diferentes intervalos de tempo (valores representados como média + desvio padrão, n=6) 77

Figura 31 - Imagens representativas da visão macroscópica do olho e fundo do olho do grupo controle (acima); implante em branco (meio); implante com fármacos (abaixo). As setas mostram o implante dentro do vítreo. Grupo controle: sem tratamento; implante em branco: implante revestido com nanofibras sem fármaco; implante com fármacos: implante revestido de nanofibra contendo dexametasona e bevacizumabe. 78

Figura 32 - A: Imagens representativas de OCT da retina de coelhos (linha superior: Grupo controle; intermediária: Placebo e linha inferior: Implante revestido); B: Imagem de OCT mostrando as camadas do segmento posterior do olho com identificação (amarelo) da medida da espessura da retina. 80

Figura 33 - Espessura retiniana dos grupos avaliados em diferentes intervalos de tempo (valores representados por média + desvio padrão, n=6). 80

Figura 34 - Cortes histológicos representativos da retina de coelhos do grupo controle e após 7, 14 e 28 dias de administração do implante revestido com nanofibras. A anatomia normal da retina foi preservada durante os 28 dias de acompanhamento. Escala: 50μm 81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sistemas de liberação de implantes intravítreos para tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho.....19

Quadro 2: Descrição dos grupos de amostra estudados 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparativo de estimativa de custo anual com fármacos anti-VEGF para tratamento de DMRI 6

Tabela 2: Média dos diâmetros das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe 43

Tabela 3: Média dos diâmetros das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe do revestimento do implante.....45

Tabela 4: Análise das Média dos diâmetros das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe do revestimento do implante e análise de variância das médias (test T de *Student*).....46

Tabela 5: Média dos diâmetros das nanofibras de PCL contendo bevacizumabe do revestimento do implante.....48

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA 1

1.1 Degeneração macular relacionada à idade 1

1.2 Tratamento DMRI exsudativa 4

1.2.1 Fármaco anti-VEGF 5

1.2.2 Utilização de bevacizumabe no tratamento da DMRI 6

1.2.3 Utilização de terapia combinada de corticosteróides intravítreos associados a inibidores angiogênicos 9

1.3 Barreiras para administração de fármacos no segmento posterior do olho e o tratamento de doenças que o acometem 11

1.4 Nanofibras Poliméricas 15

1.5 Implantes para administração intravítrea 19

2 JUSTIFICATIVA 22

3 OBJETIVO 25

3.1 Geral 25

3.2 Específicos 25

4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS DE DEXAMETASONA REVESTIDOS POR NANOFIBRAS CONTENDO BEVACIZUMABE 26

4.1 Materiais e Métodos 26

4.1.1 Materiais 26

4.1.2 Preparo dos implantes biodegradáveis de PLGA contendo dexametasona revestidos por nanofibras poliméricas de bevacizumabe 27

4.1.3 Caracterização dos implantes biodegradáveis contendo dexametasona revestido por nanofibras contendo bevacizumabe 32

4.2 Resultados e discussão 36

4.2.1 Preparo dos implantes 36

4.2.2 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura 38

4.2.3 Medidas de diâmetro das nanofibras 41

4.2.4 Estudo de degradação *in vitro* 49

4.2.5 Estudo de liberação *in vitro* 57

5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DOS IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS DE PLGA E DEXAMETASONA REVESTIDOS POR NANOFIBRAS CONTENDO BEVACIZUMABE....61
5.1 Materiais e Métodos....61
5.1.1 Materiais....61
5.1.2 Métodos....61
5.2 Resultados e discussão....64
5.2.1 Avaliação da atividade antiangiogênica dos implantes biodegradáveis revestidos por nanofibras poliméricas em modelo de membrana corioalantóica....64
6 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS DE PLGA E DEXAMETASONA REVESTIDO POR NANOFIBRAS CONTENDO BEVACIZUMABE....72
6.1 Materiais e Métodos....73
6.1.1 Materiais....73
6.2 Inserção dos implantes na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos....73
6.2.1 Avalição clínica....75
6.2.2 Tomografia de coerência óptica (OCT)....75
6.2.3 Histologia....76
6.3 Resultados e discussão....76
6.3.1 Avaliação Clínica....76
6.3.2 Tomografia de coerência óptica (OCT)....79
6.3.3 Histologia....81
7 CONCLUSÕES....83
8 PERSPECTIVAS....85
9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA OBTIDA DURANTE O DOUTORADO....86
9.1 Artigos publicados....86
9.2 Patente depositada....87
9.3 Trabalhos apresentados em eventos científicos....87
9.4 Premiação em eventos científicos....88
10 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA....89
11 ANEXOS....99

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Degeneração macular relacionada à idade

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma doença ocular crônica degenerativa que causa danos à área central da retina, região responsável pela alta resolução da visão. É uma das principais causa mundial de cegueira irreversível em adultos, juntamente com catarata, glaucoma, retinopatia diabética e erros refrativos (World Health Organization, 2022; Burton MJ, 2021; National Eye Institute, 2021). A prevalência da DMRI aumenta acentuadamente com a idade, afetando mais de 2,4% da população adulta acima de 50 anos e 12% acima de 80 anos (Chicagoca, et al., 2018). Em 2014, o número global estimado de pessoas com a doença era de 196 milhões (Wong, et al., 2014), dessas 10,4 milhões (5,3%) apresentavam dificuldade moderada ou grave da visão ao longe ou cegueira devido às formas mais graves da doença (World Health Organization, 2019). Estima-se ainda que em 2040, o número de pessoas com DMRI no mundo elevará para cerca de 288 milhões de pessoas (Wong, et al., 2014; Mitchell, et al., 2018; World Health Organization, 2019). Trata-se uma patologia irreversível e, portanto, os tratamentos disponíveis visam a interrupção da evolução da doença, mas não a sua cura ou correção (World Health Organization, 2019).

O custo global anual com tratamento da DMRI é estimado em mais de US$ 300 bilhões (Apte, 2021). Ademais, a deficiência visual representa uma grande perda de produtividade, cujo impacto na economia mundial calculado é superior a US$ 400 bilhões (World Health Organization, 2022). Além do impacto econômico há impactos na qualidade de vida, pois adultos com deficiência visual apresentam taxas de depressão e ansiedade superiores as da população em geral. E ainda, no caso de idosos, a deficiência visual contribui também para o isolamento

social, dificuldade de caminhar e um maior risco de quedas e fraturas (World Health Organization, 2019).

Apesar da existência de várias pesquisas básicas e clínicas, a patogenia da DMRI exsudativa não é totalmente conhecida devido a complexidade multifatorial da doença. No entanto, sabe-se que além dos processos angiogênicos e inflamatórios, há interação com envelhecimento, comportamentos relacionados ao estilo de vida e suscetibilidade genética (Edelhauser, et al., 2010; Nowak, 2006; Fleckenstein, 2021).

Quanto a fisiopatologia da DMRI (Figura 1), inicialmente observamos a formação de drusas, que são depósitos de resíduos de metabólitos, que fazem com que a comunicação entre os vasos na coroide e a retina sejam interrompidas, comprometendo assim a integridade do epitélio pigmentar retiniano (EPR), da membrana de Bruch e da retina (Edelhauser, et al., 2010; Nowak, 2006; Fleckenstein, 2021).

Clinicamente, a DMRI é classificada, em seu estágio menos avançado da doença, conforme o tamanho das drusas presentes. DMRI inicial é aquela que apresenta drusas de tamanhos médios e DMRI intermediária aquela com drusas grandes. Nesta etapa inicial, normalmente não há prejuízo à visão (Fleckenstein, 2021).

A DMRI em estágio avançado, pode ser classificada em dois tipos: seca e exsudativa (ou neovascularizada). A forma seca é responsável pela maior parte dos casos da doença, correspondendo a 85 a 90%. No entanto, a forma neovascular da DMRI, caracterizada por um crescimento de vasos sanguíneos no espaço subretiniano, é responsável pela maioria dos casos de cegueira ou deficiência visual (Brasil. Ministério da Saúde, 2018).

Por serem estruturalmente fracos, esses vasos apresentam vazamento de fluídos e ausência de integridade estrutural, promovem assim uma desorganização da estrutura anatômica da retina, causando lesões aos fotorreceptores, resultando em hemorragia, exsudatos e fibrose. Nos estágios

mais avançados da doença, cicatrizes substituem as estruturas normais da mácula, e se não são tratadas podem resultar em perda da visão irreversível (Figura 1) (Chicagoca, et al., 2018; Villegas V.M., 2016; Iyer, et al., 2019).

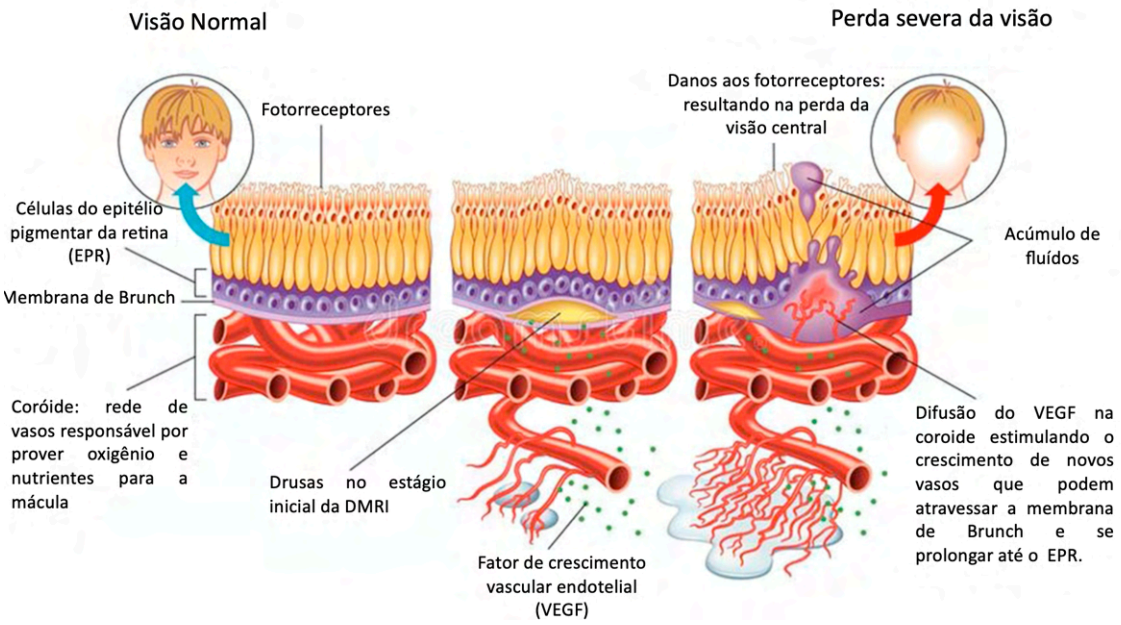


Figura 1 - Fisiopatologia da DMRI – Angiogênese.
Fonte: Iyer et al., 2019.

Um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes já identificados é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo considerado o principal mediador da angiogênese retiniana. É uma glicoproteína de 46kDa com atividades angiogênica e de permeabilidade vascular, sendo produzido no olho pelas células do epitélio pigmentado da retina. Este fator se liga com alta afinidade aos receptores de membrana com atividade tirosina quinase e sua expressão é induzida principalmente em condições de hipóxia (Shima, et al., 1995; Das, et al., 2003).

A caracterização de diferentes processos envolvidos na patogênese de doenças da retina, tais como retinopatia diabética e da DMRI, constitui um pré-requisito para o desenvolvimento de terapias para o tratamento e eventualmente

prevenção da perda da visão e cegueira (Witmer, et al., 2003). Considerando que o VEGF é a proteína envolvida no início e progressão destas doenças, juntamente com seus receptores, tornam se potenciais alvos para intervenção farmacológica (Griffioen, et al., 2000).

1.2 Tratamento DMRI exsudativa

É conhecido que o principal fator de risco para a DMRI é o avanço da idade. No entanto, outros fatores tais como etnia caucasiana, aterosclerose, dieta e tabagismo, assim como certos polimorfismos genéticos, também estão associados a doença. Entretanto, entre todos esses fatores, apenas o tabagismo e a dieta são fatores modificáveis. A interrupção do tabagismo é fortemente encorajada aos pacientes, visto que isso reduz o risco de progressão da doença (Mitchell, et al., 2018; Hanout, et al., 2013; Fleckenstein, 2021).

A conduta para tratamento da DMRI exsudativa baseava-se em terapêuticas destrutivas (fotocoagulação à laser e terapia fotodinâmica), as quais geram sequelas de maior ou menor grau ao tecido neurossensorial. Essas terapias apenas apresentam efeito de interrupção do avanço da doença, mas raramente com melhora da visão. O surgimento de terapia antiangiogênica transformou de forma significativa a terapêutica da doença, pois permitiu ganhos visuais anteriormente não atingíveis (Wong, et al., 2019; Hanout, et al., 2013), diminuindo a incidência da cegueira e deficiência visual (Mitchell, et al., 2018; Lim, et al., 2012).

Diante disso e considerando que principal mediador envolvido na fisiopatogenia da doença é o fator de crescimento do endotélio vascular, o tratamento eficaz da DMRI neovascular é atualmente baseado na inibição da proteína angiogênica VEGF (Brasil. Ministério da Saúde, 2022; Griffioen, et al., 2000; Booth, et al., 2007; Iyer, et al., 2019; Mitchell, et al., 2018). Seguindo essa mesma linha de

escolha de tratamento, em 2022, o Ministério da Saúde do Brasil, revisou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) de Degeneração Macular Relacionada à Idade - Forma Neovascular (Portaria conjunta nº 4, de 4 de março de 2022) com as diretrizes para o diagnóstico e tratamento da DMRI neovascular com ênfase na terapêutica antiangiogênica.

1.2.1 Fármaco anti-VEGF

Há cerca de 25 anos, a degeneração macular relacionada à idade era considerada praticamente intratável. No entanto, novos produtos farmacêuticos baseados na supressão do fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF) mudaram a perspectiva do paciente ao introduzir uma terapêutica farmacológica, na forma de injeção intravítrea contínua ou intermitente (Lim, et al., 2012). Em 2004, o primeiro anti-VEGF a aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DMRI exsudativa foi o pegaptanibe sódico (Macugen®, EyeTech/Pfizer), seguido pelo ranibizumabe (Lucentis®, Genentech). Mais recentemente, o bevacizumabe (Avastin®, Genentech), o aflibercept (Eylea®, Bayer) e o brolucizumabe-dbll (Beovu®, Novartis) foram introduzidos como terapia intravítrea (Apte, 2021).

Em 2006, estudos clínicos de referência mostraram que injeções intravítreas mensais de ranibizumabe evitaram a perda de visão em quase 95% dos pacientes e melhoram significativamente a visão em 40%. Estudos mostraram que a cegueira atribuível à degeneração macular relacionada à idade foi reduzida em 50% em alguns países desde a introdução de antagonistas do VEGF (Bloch, et al., 2012; Lim, et al., 2012).

Esses fármacos anti-VEGF, exceto o bevacizumabe, são aprovados pelo FDA para o tratamento da DMRI. Entretanto, o bevacizumabe tornou se uma opção

mundialmente popular devido ao seu baixo custo (Tabela 1) e eficácia semelhante aos outros da mesma classe terapêutica (Lim, et al., 2012; Hanout, et al., 2013; Schmidt-Erfurth, et al., 2014; Apte, 2021).

Tabela 1: Comparativo de estimativa de custo anual com fármacos anti-VEGF para tratamento de DMRI

Fármaco	U$
Bevacizumabe	24.024
Brolucizumabe	88.047
Aflibercept	98.318
Ranibizumabe	156.316

Fonte: CADTH - Canadian Agency for Drugs and Technologies, 2020

1.2.2 Utilização de bevacizumabe no tratamento da DMRI

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado constituído por 214 aminoácidos, de ponto isoelétrico em pH de 8,3 e massa molar de aproximadamente 149kDa que se liga a todas as isoformas do VEGF-A, inibindo sua ligação aos seus receptores Flt-1 (VEGFR-1), KDR (VEGFR-2) e Flt-4 (VEGFR-3) na superfície das células endoteliais. (Cabral, et al., 2017; Biswas, et al., 2010; Schmidt-Erfurth, et al., 2014). Tem sido utilizado com frequência em injeções intravítreas para o tratamento de DMRI e apresenta meia-vida de 5,6 dias (Schmidt-Erfurth, et al., 2014). É capaz de restaurar o desequilíbrio angiogênico, neutralizando a atividade biológica do VEGF e diminuindo a vascularização, reduzindo assim as alterações exsudativas proporcionando melhoras significativas na função visual (Booth, et al., 2007; Griffioen, et al., 2000; Iyer, et al., 2019).

Aprovado pelo FDA e *European Medicines Agency* (EMEA), está registrado na ANVISA para o tratamento intravenoso de câncer colorretal metastático e outros tipos de câncer (Schmidt-Erfurth, et al., 2014; Hanout, et al., 2013). Além da sua

aplicação no tratamento de câncer, devido ao seu efeito inibidor da angiogênese, o fármaco passou a ser utilizado de forma *off-label* por meio de injeções intravítreas para tratamento de doenças oculares causadoras de angiogênese, com resultados satisfatórios (Schmidt-Erfurth, et al., 2014; Apte, 2021). Em julho de 2018, sua eficácia no tratamento da DMRI foi reconhecida no Brasil e assim o Ministério da Saúde aprovou, através da Portaria Conjunta nº 18 de 2018, o PCDT da Degeneração Macular Relacionada á Idade (Forma Neovascular) introduzindo o "uso excepcional, de caráter temporário, no âmbito do Sistema Único de Saúde, do medicamento Avastin® (25mg/mL solução para diluição para infusão), no tratamento da Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI)." Em 2022, essa portaria foi revisada e a recomendação da utilização de bevacizumabe para tratamento da DMRI foi mantida, sendo seu uso preconizado para o tratamento de pacientes acima de 60 anos (Brasil. Ministério da Saúde, 2022).

Conforme diretrizes a dose intravítrea a ser aplicada é de 1,25 mg/ 0,05 mL por olho. Sendo que o esquema com maiores índices de melhora da acuidade visual recomenda a administração mensal por dois anos. Além de 24 meses, não há recomendação devido a ausência de estudos que incluem esse período (Brasil. Ministério da Saúde, 2022). O CADTH, atualmente recomenda a dose de 1,25 mg, por olho, a cada 4 semanas, nas primeiras três doses e posteriormente, 0,5mg a cada 4 semanas (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2020).

Devido a rápida circulação de sangue na região do vítreo e retina a manutenção da concentração terapêutica no segmento posterior do olho é ainda um grande desafio (Lim, et al., 2012; Agrahari, et al., 2017; Adrianto, et al., 2021).

As terapias intravítreas tradicionais com o bevacizumabe requerem frequentes injeções e diante disso, estudos descritos na literatura, como os mencionados a seguir, apontam a busca por melhoria na formulação atual com o objetivo de obtenção de sistemas de liberação prolongada do fármaco, mantendo assim a

concentração no segmento posterior do olho, dentro do nível terapêutico por mais tempo, reduzindo assim a frequência de administração do fármaco.

Uma formulação de lipossomas contendo bevacizumabe foi desenvolvida e aplicada por injeção intravítrea em olhos de coelhos e comparada à uma solução do mesmo anticorpo. A concentração de bevacizumabe livre nos olhos dos animais que receberam a formulação de lipossomas foi 1 e 5 vezes superior a solução do anticorpo nos tempos de 28 e 42 dias, respectivamente (Abrishami, et al., 2019).

Nanopartículas de ácido polilático revestidas de bevacizumabe foram encapsuladas em micropartículas porosas de PLGA por infusão supercrítica e pressão. O estudo de liberação *in vitro*, demonstrou a presença do bevacizumabe por um período de 4 meses, sem alteração da estrutura e atividade do anticorpo. O estudo de liberação *in vivo*, realizado em ratos detectou a presença do bevacizumabe durante 2 meses (Yandrapu, et al., 2013).

Outra formulação avaliada, foi um hidrogel termosensível contendo bevacizumabe. Essa formulação se mostrou segura para a retina, pois após um mês de aplicação intravítrea do sistema, não foi observada nenhuma alteração na retina dos coelhos. Desse mesmo sistema foi verificado, em cultura de células, a manutenção da atividade antiangiogênica do bevacizumabe incorporado no hidrogel durante o período do estudo de liberação de 11 dias (Hu, et al., 2014).

O perfil de liberação *in vivo* do bevacizumabe incorporado em uma outra formulação de hidrogel também foi estudado. A formulação foi administrada por injeção intravítrea e foi bem tolerada em olhos de coelhos. O hidrogel foi capaz de promover a liberação do bevacizumabe por um período de 9 semanas e a concentração do fármaco foi mantida 4,7 vezes superior à concentração dos olhos que receberam apenas injeção de solução de bevacizumabe (Rauck, et al., 2014).

Em nosso grupo de pesquisa, um sistema polimérico de poliuretano biodegradável contendo bevacizumabe foi desenvolvido e a atividade antiangiogênica do anticorpo monoclonal foi estudada em modelo de neovascularização da córnea. O bevacizumabe liberado a partir do sistema desenvolvido foi capaz de promover a redução do número de vasos na córnea sem causar toxicidade para os tecidos (Ferreira, et al., 2017).

Outra formulação envolvendo o nanoencapsulamento de bevacizumabe com PLGA com o objetivo de proteger o fármaco e liberá-lo de maneira controlada, aumentando o tempo entre as administrações teve seu desenvolvimento bem-sucedido (Sousa, et al., 2017).

1.2.3 Utilização de terapia combinada de corticosteróides intravítreos associados a inibidores angiogênicos

Estudos têm demonstrado que a administração intravítrea de corticosteróides bloqueia a ruptura da barreira hematorretiniana induzida por VEGF e o edema intrarretiniano pela modulação das proteínas que atuam nos receptores de VEGF. Além disso, corticosteróides como a dexametasona, atuam por meio da redução da exsudação e regulação dos mediadores inflamatórios (Vakalis, et al., 2015; Todorich, et al., 2017).

O anti-inflamatório corticosteróide quando injetado no olho, bloqueia a formação de edema (líquido sob a mácula) e potencializa tratamentos convencionais com anti-VEGF. Os principais efeitos dos corticosteróide nos tecidos oculares incluem: redução da resposta imune celular; redução da permeabilidade vascular inflamatória; estabilização da barreira hemato-aquosa; inibição da proliferação epitelial; inibição da neovascularização corneal inflamatória; redução do tempo de cicatrização; elevação da pressão intravítrea; e indução de catarata (Sherif, et al., 2002).

A dexametasona e seus derivados, utilizados em oftalmologia desde a década de 50, são os fármacos mais empregados no tratamento de inflamações oculares, devido à sua segurança e à sua potência anti-inflamatória (Vakalis, et al., 2015). A dexametasona é capaz de inibir a expressão do VEGF, suprimindo, portanto, a angiogênese (Vakalis, et al., 2015). Além disso, ela é também tem o potencial de eliminar a inflamação através da inibição de múltiplas citocinas inflamatórias, resultando em redução do edema, da deposição de fibrina, da dilatação capilar e da migração de células inflamatórias. O VEGF é uma citocina que é expressa em concentrações aumentadas no local do edema macular. Os corticosteróides impedem a liberação de prostaglandinas, algumas das quais foram identificadas como sendo mediadoras do edema macular.

Atualmente o tratamento de escolha da DMRI neovascular incorpora injeções intravítreas de agentes anti-VEGF (Brasil. Ministério da Saúde, 2022) que ocasionalmente podem ser combinadas com outras modalidades (Lim, et al., 2012). Sendo assim, as terapias anti-inflamatórias podem ser uma opção de escolha de associação farmacológica à terapia anti-VEGF, principalmente quando ocorre o edema macular ou a obstrução da veia retiniana.

A combinação da administração intravítrea de bevacizumabe e dexametasona constitui, portanto, uma alternativa eficaz para a melhora do tratamento de DMRI. Além disso, estudos sugerem que a combinação desses dois fármacos, atuam de forma sinérgicas, possibilitando o aumento do tempo entre injeções intravítreas subsequentes e a melhora da acuidade visual em pacientes com DMRI neovascular (Vakalis, et al., 2015; Singer, et al., 2012).

1.3 Barreiras para administração de fármacos no segmento posterior do olho e o tratamento de doenças que o acometem

O olho é o órgão sensorial responsável pela visão. Sua construção é sofisticada, com complexo e eficiente mecanismo de proteção o qual inclui barreiras anatômicas (conjuntiva, córnea, esclera, barreira hematorretiniana) e fisiológicas (fluxo sanguíneo na coroide, lacrimação induzida, drenagem nasolacrimal) (Agrahari, et al., 2017; Awwad, et al., 2017). O olho pode ser anatomicamente dividido em dois segmentos: o anterior e posterior (Figura 2). O anterior corresponde a um terço do olho é formado por filme lacrimal, córnea, conjuntiva, câmara anterior e posterior, íris, corpo ciliar, lente e humor aquoso. O segmento posterior corresponde a dois terços do olho e abrange as seguintes estruturas: coroide, esclera, humor vítreo, nervo ótico e retina (Nayak, et al., 2018; Agrahari, et al., 2017; Awwad, et al., 2017; Adrianto, et al., 2021).

A retina é a parte do olho responsável pela formação de imagens e pela visão de detalhes. A mácula está localizada na região central da retina e é responsável pela visão central e por dar foco ao que enxergamos (Fleckenstein, 2021). Os fotorreceptores são células que captam a luz que chega até a retina e transmitem como um impulso nervoso permitindo assim que o cérebro reconheça a imagem. O epitélio pigmentar da retina é uma estrutura essencial da retina e proteção dos fotoreceptores, forma uma barreira entre a retina e coroide, juntamente com a membrana de brunch. A coroide é a região vascularizada responsável pela nutrição da parte externa da retina (Adrianto, et al., 2021).

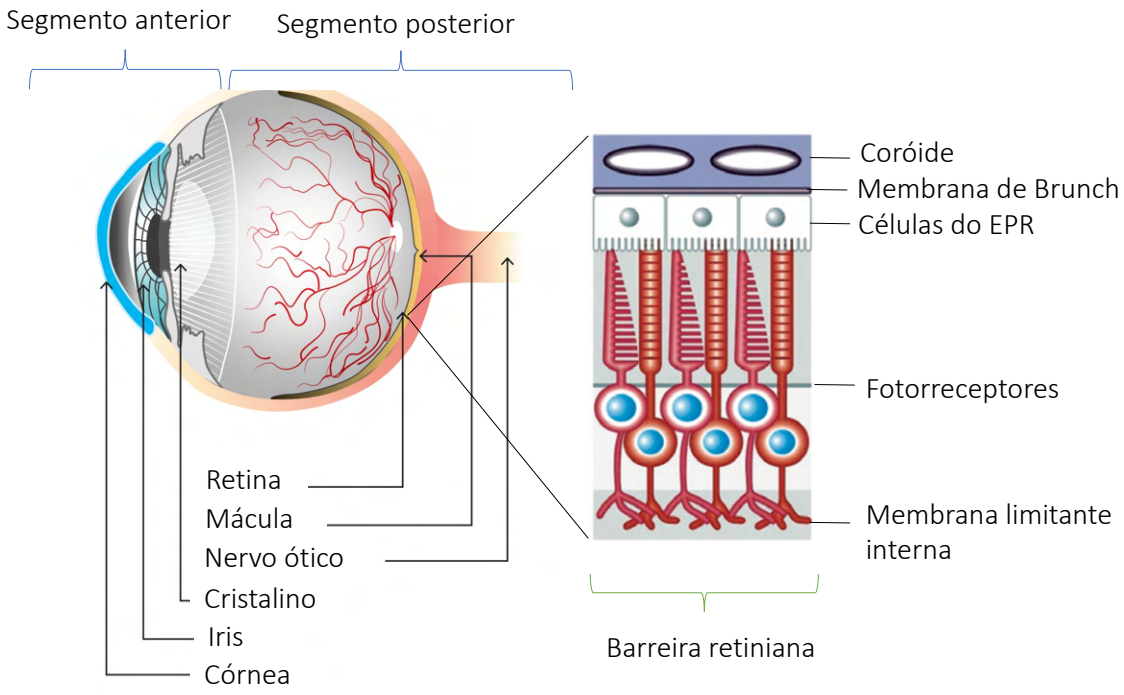


Figura 2 - Principais estruturas oculares

Fonte: Adaptado de Nayak, et al., 2018; Iyer, et al., 2019; Gerenutti, et al., 2013; Rattner, et al., 2006; World Health Organization, 2019

Os mecanismos de proteção dos olhos, ao mesmo tempo que são barreiras de grande importância para proteção de substâncias exógenas e estresse externos, são também os obstáculos que dificultam o tratamento de doenças oculares, em especial no segmento posterior, dificultando que os fármacos cheguem ao local de ação (Nayak, et al., 2018; Agrahari, et al., 2017; Awwad, et al., 2017).

As vias mais empregadas para administração de fármacos no segmento posterior do olho (Figura 3) são: tópica, periocular (subconjuntival, subtenoniana e retrobulbar), sistêmica, intravítrea e supracoroidal) (Agrahari, et al., 2017; Adrianto, et al., 2021; Kang-Mieller, et al., 2014).

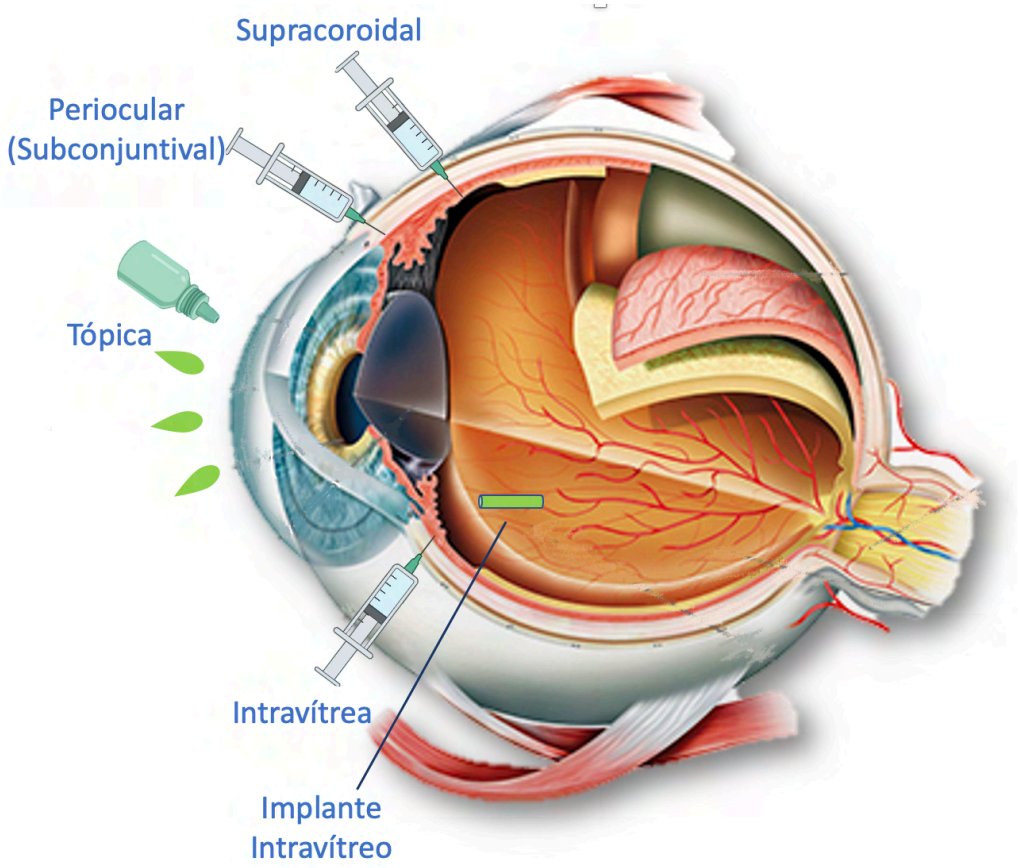


Figura 3 - Vias de administração de fármacos mais empregadas para tratamento do segmento posterior.
Fonte: Adaptado de Agrahari et al., 2017, Iyer et al., 2019.

O tratamento de doenças oculares no vítreo e na retina tem sido um desafio devido à dificuldade de acesso a essas estruturas. A administração ocular tópica, na forma de colírios, é o método menos invasivo, mais conveniente e apesar de ser o utilizado, apresenta baixa biodisponibilidade corneal e exposição sistêmica causada pela drenagem nasolacrimal o que resulta em concentrações mais elevadas nos tecidos anteriores (córnea, conjuntiva, esclera, humor aquoso e corpo ciliar). Além disso, apresenta pouco efeito terapêutico na região posterior do olho (lente, vítreo e retina), necessitando, para manutenção da dose, de frequentes aplicações da formulação. Estima-se que menos de 5% da dose administrada pela via tópica é absorvida e uma fração menor ainda, cerca de 0,001%, é capaz de atingir os tecidos intravítreos (Kaur, et al., 2014).

A via periocular é utilizada no tratamento de doenças do segmento posterior do olho por meio das injeções subconjuntival e subtenoniana. Essa via apresenta melhor biodisponibilidade (0,01% a 0,1%) quando comparada à via tópica, mas é menos eficiente em relação a intravítrea, mesmo permitindo a administração de um volume de solução cerca de dez vezes maior (volume de injeção da via periocular é de 500µl a 5000µl e 50µl a 100µl para a intravítrea) (Kaur, et al., 2014).

A via sistêmica pode ser utilizada com o objetivo de atingir o segmento posterior do olho, no entanto observa-se baixa biodisponibilidade no olho causada pela existência da barreira hematorretiniana, que dificulta a entrada de substâncias da circulação sanguínea para a retina. Para que se obtenha uma concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica utilizando essa via, é necessária a administração de frequentes e elevadas concentrações durante um período prolongado, podendo consequentemente causar sérios efeitos adversos (Kuppermann, et al., 2007; Lajavardi, et al., 2007; Iyer, et al., 2019; Kang-Mieller, et al., 2014; Kang-Mieller, et al., 2014).

A via intravítrea era restrita ao tratamento de endoftalmite, mas, atualmente, tem sido utilizada para tratamento de casos de vitreorretinopatia proliferativa, retinite viral e uveíte. A injeção intravítrea, apesar de mais invasiva é também uma alternativa para a obtenção da concentração adequada de fármacos no vítreo e na retina. A rápida circulação sanguínea no local de aplicação, entretanto, promove uma redução da meia-vida dos fármacos administrados, diminuindo rapidamente sua concentração à níveis subterapêuticos. Consequentemente, para a manutenção das concentrações terapêuticas no vítreo e retina, são necessárias repetidas injeções intravítreas, as quais impactam negativamente na continuidade do tratamento, pois além de poderem gerar desconforto para o paciente, possibilitam também a apresentação de complicações tais como endoftalmite, inflamação ocular, aumento da pressão intraocular e descolamento de retina (Peyman, et al., 1995; Okabe, et al., 2003; Nair, et al., 2007; Kaur, et al., 2014; Agrahari, et al., 2017; Adrianto, et al., 2021).

Devido às dificuldades de manutenção de níveis terapêuticos e de efeitos adversos causados pelos tratamentos, estudos têm sido conduzidos visando o desenvolvimento de sistemas que sejam capazes de manter a concentração dos fármacos no segmento posterior do olho, dentro da faixa terapêutica, por um período prolongado (Fialho, et al., 2003; Silva, et al., 2010; Adrianto, et al., 2021).

A idealização desses sistemas passa pelo conceito de que devem ser biocompatíveis com o organismo, sendo assim, os componentes nele presentes devem ser não carcinogênicos, hipoalergênicos e não causadores de resposta inflamatória no local de aplicação. Esses sistemas podem ser preparados a partir de polímeros biodegradáveis ou não-biodegradáveis, sendo que aqueles compostos por polímeros não-biodegradáveis, apesar de apresentarem uma taxa de liberação relativamente constante possuem a desvantagem da necessidade de procedimentos cirúrgicos para sua posterior remoção (Fialho, et al., 2003; Silva, et al., 2010).

Por outro lado, aqueles compostos por polímeros biodegradáveis, podem apresentar vantagens por serem totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando remoção subsequente, e proporcionando assim melhor adesão e aceitação do paciente ao tratamento. Polímeros biodegradáveis sintéticos, representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poli(orto-ésteres), poliuretanos e poliacrilamidas têm apresentado crescente interesse na aplicação como sistemas de liberação de fármacos (Fialho, et al., 2003; Silva, et al., 2010; Eljarrat-Binstock, et al., 2010; Adrianto, et al., 2021).

1.4 Nanofibras Poliméricas

Nanofibras poliméricas são estruturas de duas dimensões, sendo uma delas em escala nanométrica. O interesse, das mais diversas áreas da ciência, em

nanofibras tem aumentado em função das propriedades associadas a estes materiais, bem como o grande número de possíveis aplicações, como por exemplo nas áreas de eletrônica, física, química, medicina, biologia e a engenharia de materiais (Chronalis, 2005; Chew, et al., 2006). Nos últimos anos, motivada pelas diferentes possibilidades de aplicações do material na área farmacêutica, a comunidade científica demonstrou um especial interesse na produção de nanofibras poliméricas visando a liberação de fármacos para tecidos alvo (Song, et al., 2008).

Nanofibras produzidas a partir do processo de eletrofiação apresentam vantagens, tais como alta área superficial, flexibilidade para uma grande variedade de formas e tamanhos além de permitir o encapsulamento de substâncias bioativas frágeis e hidrossolúveis, tais como anticorpos monoclonais como o bevacizumabe (Huang, et al., 2003; Bhardwa, et al., 2010).

A eletrofiação ou fiação eletrostática (*electrospinning)* é uma técnica utilizada para processamento de materiais poliméricos (polímeros em solução) que permite a formação de fibras em malhas ou mantas em tamanhos micrométricos e nanométricos (10nm a 10μm) (Eichhorn, 2005). Esses materiais, em formato de fios, devido às possibilidades de aplicação, ganharam destaque em função de suas propriedades associadas à escala nanoméricas (Mattoso, et al., 2012). Além do pequeno diâmetro, apresentam área superficial elevada (Homaeigohar, et al., 2017) e ainda podem ser servir como proteção à degradação dos fármacos, sendo todas essas caraterísticas essenciais para a formação de um sistema de liberação prolongada.

Para o processo de eletrofiação necessita-se basicamente de três componentes: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar acoplado a uma agulha e uma placa condutora (coletor metálico) aterrada (Figura 4). O tubo capilar contendo o polímero em solução é conectado a um eletrodo ligado à fonte de alta tensão, gerando assim um campo elétrico. Esse tubo é mantido à uma certa distância da placa coletora aterrada que pode estar em constante rotação.

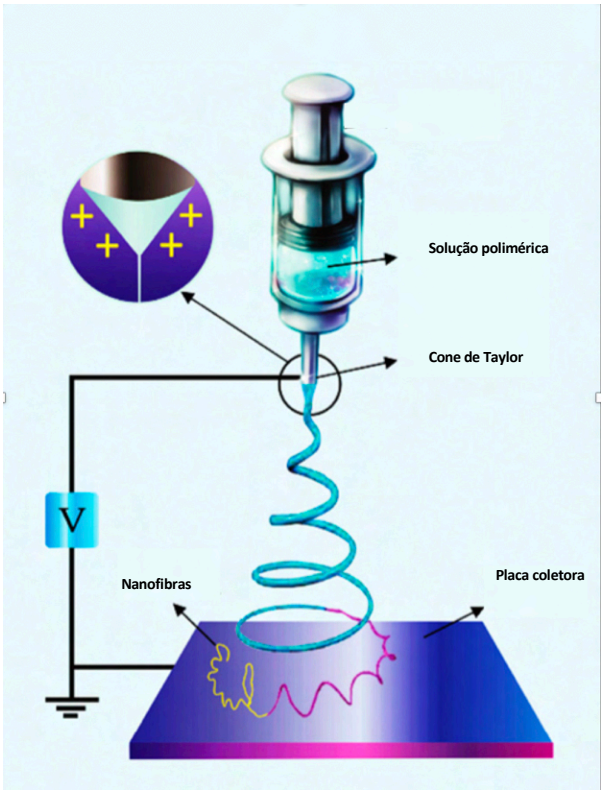


Figura 4 - Esquema do processo de eletrofiação
Fonte: CHEN, et al., 2016.

Dessa forma, na eletrofiação a gota da solução contendo o polímero é submetida a um potencial elétrico, na maioria das vezes positivo, que faz com que essa superfície da gota sofra gradativamente um estiramento até que subitamente ocorre a formação de um jato estável em formato cônico (Cone de Taylor) (Mattoso, et al., 2012; Ramakrishna S., 2005).

A gota do polímero alonga-se quando uma carga eletrostática aplicada supera a tensão superficial da solução (a concentração de emaranhamento crítico) formando um jato que se desloca até a região de menor potencial eletrostático que é o coletor aterrado. Sendo que quanto maior foi a intensidade do campo elétrico, maior é a intensidade do estiramento. Durante esse trajeto o solvente no qual o polímero encontra-se solubilizado evapora rapidamente e assim o

polímero precipita (eletrodeposição), formando fibras que podem ser coletadas na placa metálica, formando uma manta de nanofibras (Homaeigohar, et al., 2017; Ramakrishna S., 2005).

O uso de nanofibras como suporte para o desenvolvimento de sistema de administração e liberação prolongado ou controlado de fármacos é uma área de grande interesse e por isso, vários estudos têm sido conduzidos. Entre esses estudos encontram-se o desenvolvimento de membranas de nanofibras com material mucoadesivo para liberação de antibióticos, de aplicação na cavidade bucal que teve como objetivo o tratamento de infecções na gengiva (Nista, et al., 2013).

Em outro trabalho, nanofibras poliméricas carregadas com oxitetraclicina foram desenvolvidas para o tratamento de alveolite seca, e apresentaram resultados de regeneração tecidual (Aulestia-Vieira, et al., 2019). O desenvolvimento de nanofibras de polivinilpirrolidona K30 carregadas com ibuprofeno com objetivo de obtenção de uma formulação de rápida desintegração também foi descrito (Yu, et al., 2009). Outro sistema nanotransportador com potencial terapêutico para tratamento de câncer de boca foi elaborado a partir de nanofibras poliméricas carregadas com o fármaco docetaxel (Singh, et al., 2015).

Em nosso grupo de pesquisa também foram desenvolvidos com sucesso sistemas de liberação prolongada de fármacos a partir de nanofibras. Um desses sistemas contendo bevacizumabe em seu núcleo teve a atividade antiangiogênica do anticorpo monoclonal estudada em modelo de neovascularização da córnea. O bevacizumabe incorporado no sistema desenvolvido, possibilitou uma liberação de forma prolongada e foi capaz de promover a redução do número de vasos na córnea demonstrando sua potencialidade para uso em tratamento de doenças que envolvem angiogênese (De Souza, et al., 2018). O outro trabalho foi um sistema contendo furoato de mometasona para tratamento de rinossinusite crônica (Rivelli, et al., 2021).

1.5 Implantes para administração intravítrea

Algumas aplicações dos implantes para administrações intravítreas (Quadro 1) já estão sendo utilizadas em seres humanos e a intensificação das pesquisas visando à obtenção de sistemas intravítreos de liberação de fármacos indica perspectivas reais para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho (Eljarrat-Binstock, et al., 2010).

Quadro 1: Sistemas de liberação de implantes intravítreos para tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho

Marca e fabricante	**Fase estudo clínico ou aprovação pelo FDA**	**Indicativo terapêutico**	**Fármaco e matriz**	**Tempo de liberação**
NCT02087085 (Allergan)	Estudo clínico finalizado em 2019.	DMRI seca	Brimonidina (0,4 mg e 0,2mg) com PLGA/PLA	3 meses
Iluvien® (Alimera Sciences, Inc.)	Aprovado em 2011. Comercializado na Europa e Reino Unido Fase II Fase III	DME DMRI Uveíte posterior	Acetonido de Fluocinolona (0,19 mg) com poliimida/PVA	2-3 anos
NT-503 (Neurotech Pharma)	Estudo clínico finalizado em 2016.	DMRI seca	Receptor da proteína Anti-VEGF	2 anos
Ozurdex® (Allergan)	Aprovado pelo FDA em 2009. Comercializado nos Estados Unidos.	DME, CRVO, uveíte	Dexametasona (0,7 mg) com PLGA	6 meses
Posurdex® (Allergan)	Fase III	DME, uveíte posterior	Dexametasona (0,35 mg) com PLGA	6 meses
Retisert® (Bausch & Lomb)	Aprovado pelo FDA em 2005. Comercializado nos Estados Unidos.	Uveíte posterior crônica não infecciosa, DME, CRVO	Acetonido de fluocinolona (0,59 mg) e com (2,1mg) com silicone/PVA	2,5 anos
Vitrasert® (Bausch & Lomb)	Aprovado pelo FDA em 1996. Descontinuado e, 2013.	CMRV	Ganciclovir com EVA/ PVA	5-8 meses
I-vation® (Surmodics Inc)	Estudo clínico finalizado em 2021.	DME	Acetonido de Triancinolona (0,925 mg) com PMMA/EVA	2 anos
Yutiq® (eye Point Pharmaceuticals)	Aprovado pelo FDA em 2018. Comercializado nos Estados Unidos.	Uveite posterior	Acetonido de Fluocinolona (0,18mg) com Poliamida/PVA	3 anos
NCT02510794 (Genetech/Roche/ ForSight VISION4)	Aprovado pelo FDA em 2021.	DMRI	Ranibizumabe (20 ou 40mg/mL aproximadamente 0,8 mg dose) *Port Delivery System* (implante permanente)	6 meses

CMRV: retinite por citomegalovírus; CRVO: oclusão da veia central da retina; DMRI: degeneração macular relacionada à idade; DME: edema macular diabético; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; EVA: poli(etileno-co-acetato); PLGA; poli(láctico-co-glicólico); PLA: Ácido Polilático; PMMA: nn(metil metacrilato); PVA: álcool polivinílico
Fonte: http://www.clinicaltrials.gov, 2023., Adrianto, et al, 2021.

Nesse contexto, o uso de implantes intravítreos tem apresentado grande interesse, pois visam reduzir a frequência de administração, obtendo assim menos efeitos adversos relacionados à essa invasiva forma de administração o que por consequência geram um maior conforto e adesão do paciente ao tratamento (Neumann, et al., 2019). Aproveitando o estado imuno-privilegiado do olho, muitos implantes foram usados com sucesso sem provocar a reação inflamatória local significativa que normalmente seria encontrada com implantes empregados em outras partes do corpo (Fialho, et al., 2003; Awwad, et al., 2017). Os implantes intravítreos que permitem a liberação sustentada de fármacos estão em diferentes estágios de desenvolvimento.

Três formulações de implante intravítreo contendo corticosteróides, sendo duas com o acetonido de fluocinolona e outro com a dexametasona estão disponíveis no mercado.

Comercializado pela Allergan, o Orzudex® é um implante intravítreo biodegradável, na forma de bastão, que contém 0,7mg de dexametasona. Sua indicação terapêutica abrange o tratamento de edema macular e de processos inflamatórios da região posterior dos olhos. A implantação do Orzudex®, apesar de requerer procedimento cirúrgico, não apresenta necessidade de sutura pós aplicação que é facilitada pelo aplicador de uso único que acompanha o produto (Kuppermann, et al., 2007).

O Retisert® trata se também de um implante intravítreo de 0,58mg acetonida de fluocinolona comercializado pela Bausch & Lomb, indicado para o tratamento de uveítes não infecciosa crônica. A grande desvantagem deste produto está no fato de ter uma matriz não biodegradável e assim, após a liberação do fármaco, requer procedimento cirúrgico para a sua remoção. Uma outra desvantagem é que devido ao seu formato de comprimido a sua implantação também requer um procedimento cirúrgico de maior dimensão do que o Orzudex®, necessitando inclusive de sutura pós procedimento (Jaffe, et al., 2006).

O Iluvien®, comercializado pela Alimera Sciences, Inc. também trata se de um implante intravítreo de acetonida de triancinolona indicado para o tratamento de edema macular diabético, porém de menor dose 0,19mg, mas apresenta como matriz o poliimida, um polímero não biodegradável (Kane, et al., 2008).

No entanto, os três produtos, devido ao uso prolongado de altas doses de corticosteróides, apresentam complicações tais como ocorrência de catarata subcapsular posterior, aumento da pressão intravítrea, glaucoma além da possibilidade de intensificar a instalação de infecções oculares secundárias por bactérias, fungos ou vírus (Jaffe, et al., 2006; Kane, et al., 2008; Arcinue, et al., 2012).

Além dos produtos que são comercializados, há alguns estudos descritos na literatura com relação a aplicação intravítrea de sistemas de liberação prolongada de dexametasona. Como por exemplo, o estudo clínico de fase I, realizado por Silva-Cunha e colaboradores, com implante biodegradável contendo 0,350 mg para o tratamento de edema macular (Cunha, et al., 2016). Esse estudo demonstrou a viabilidade e segurança da injeção intravítrea de dexametasona usando uma cânula de 25 gauge, além do resultado promissor do produto testado, atentando para a vantagem de sua dosagem ser correspondente à metade da atualmente comercializada pela Allergan, o que pode resultar na ocorrência de menos reações adversas. Um outro aspecto de grande interesse desse estudo está em um subgrupo de paciente o qual receberam além do implante de dexametasona, injeção intravítrea do fármaco anti-VEGF ranibizumabe, demonstrando uma influência positiva nos resultados dos testes de melhora da acuidade visual e espessura central do subcampo inferindo a essa associação de fármacos a maior duração dos efeitos observados (Cunha, et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

As maiores causas de cegueira e perda da visão no mundo são catarata, glaucoma e a DMRI. A DMRI, afeta aproximadamente 10% dos adultos acima de 60 anos (Iyer, et al., 2019; Wong, et al., 2014). Em 2040, estima-se que a população mundial afetada pela DMRI será em torno de 300 milhões de pessoas (Wong, et al., 2014; Mitchell, et al., 2018; World Health Organization, 2019).

Estudos recentes têm demonstrado que o VEGF e as células inflamatórias atuam de forma interativa na patogênese da DMRI. Desta forma, enquanto os inibidores de VEGF apresentam efeito terapêutico pela inibição deste fator, os corticosteróides apresentam propriedades anti-inflamatória, anti-exsudativa e antiangiogênica além de prevenir a ruptura da barreira hematorretiniana (Vakalis, et al., 2015; Todorich, et al., 2017). A combinação dessas duas classes de fármacos pode, portanto, constituir uma alternativa eficaz no tratamento da doença.

A forma mais utilizada para administração de fármacos no segmento posterior do olho é por meio de injeções intravítreas, o que apresenta sucesso terapêutico limitado devido à rápida eliminação das substâncias do olho, necessitando de injeções frequentes que trazem complicações para o paciente e baixa adesão ao tratamento. Os implantes poliméricos para aplicação intravítrea constituem uma alternativa promissora pois apresentam as vantagens de liberação do fármaco diretamente no local de ação, manutenção de níveis terapêuticos adequados do fármaco por períodos prolongados, maior adesão do paciente ao tratamento e redução dos efeitos adversos sistêmicos (Fialho, et al., 2003; Fialho, et al., 2007).

Nanofibras poliméricas biodegradáveis apresentam grande interesse de utilização como sistema de liberação de fármacos pois possuem alta área

superficial, flexibilidade para uma grande variedade de formas e tamanhos e a capacidade de controlar a sua composição de modo a alcançar os resultados de liberação pretendidos (Garg, et al., 2011) e, por permitirem o uso de solventes não orgânicos no preparo, são capazes de encapsular substâncias bioativas frágeis e hidrossolúveis com grande eficiência sem o risco de perda da conformidade estrutural e da atividade.

O tratamento de escolha para a forma exsudativa da DMRI é a administração intravítrea de fármacos anti-VEGF e este pode ser associado a anti-inflamatório da classe dos corticosteróides, visando assim uma ação de supressão da inflamação através da inibição de múltiplas citocinas inflamatórias podendo assim potencializar tratamentos convencionais com anti-VEGF. E embora os estudos clínicos tenham demonstrado a eficácia dos agentes anti-VEGF na melhora da acuidade visual, as injeções intravítreas frequentes, necessárias para o tratamento e controle da progressão das doenças, podem apresentar complicações oculares.

Sendo assim, uma alternativa ao uso de injeções intravítreas é o uso de sistemas de liberação prolongada de fármacos implantados dentro do olho por serem assim capazes de mantê-los em níveis terapêuticos eficazes, por longos períodos, minimizando a possibilidade de efeitos colaterais.

Diante das questões expostas acima, entende-se que o desenvolvimento de dispositivos intravítreos, como opção terapêutica às injeções intravítreas, é uma necessidade e uma alternativa para o tratamento da DMRI e outras doenças oculares que envolvem o segmento posterior ocular.

Consequentemente, uma nova abordagem no tratamento da DMRI, que inclui a inibição do VEGF e a redução da inflamação, deve ser levada em consideração.

Apresenta-se, portanto, como uma opção vantajosa o desenvolvimento de implantes biodegradáveis contendo dexametasona revestidos por nanofibras poliméricas contendo bevacizumabe. Sendo que o corticosteróide constituinte deste sistema desenvolvido apresenta uma dosagem menor do que o produto

atualmente comercializado na forma de implante, (Orzudex ®), evitando assim as complicações geradas pelo uso prolongado de altas doses.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Desenvolver e investigar a atividade e segurança de implante intravítreo biodegradável de PLGA contendo dexametasona, revestido por nanofibras poliméricas contendo bevacizumabe para tratamento de degeneração macular relaciona à idade.

3.2 Específicos

- Desenvolver e caracterizar implantes poliméricos de dexametasona revestido por nanofibras carregadas com bevacizumabe;
- Avaliar a atividade dos implantes revestidos em modelo de membrana corioalantóica;
- Avaliar a liberação *in vitro* dos fármacos incorporados aos implantes revestidos;
- Avaliar a segurança dos implantes revestidos em olhos de coelhos.

4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS DE DEXAMETASONA REVESTIDOS POR NANOFIBRAS CONTENDO BEVACIZUMABE

Esta etapa do trabalho consistiu no desenvolvimento dos implantes intravítreos biodegradáveis contendo acetato de dexametasona revestidos com nanofibras carregadas com bevacizumabe.

O preparo do implante revestido foi dividido nas seguintes etapas:

- Preparo do implante com dexametasona;
- Desenvolvimento e preparo de nanofibras contendo bevacizumabe e sem fármaco;
- Revestimento dos implantes de dexametasona com as nanofibras.

A morfologia de superfície dos implantes foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a degradação *in vitro* foi acompanhada por meio da perda de massa. O estudo de liberação *in vitro* do fármaco disponível no meio foi avaliado pela quantificação do bevacizumabe e da dexametasona.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Materiais

Acetato de dexametasona (MM = 434,5 g/mol; solubilidade em água a 37°C = 0,1 mg/mL; Sigma-Aldrich, EUA), polímero poli (D,L-lático-co-glicólico) 50:50 (PLGA 50:50, Resomer® RG 503H, Evonik, Alemanha), acetonitrila grau CLAE (Merck, Alemanha), água purificada (Milli Q, Millipore, EUA), poli(ε-caprolactona)

(PCL, massa molar 80.000 a 90.000g/mol, Sigma Aldrich, EUA); ácido acético 99% (Sigma Aldrich, EUA); álcool polivinílico (PVA, 98-99% hidrolisado, massa molar 146.000-186.000 g/mol, Sigma Aldrich, EUA); bevacizumabe (Avastin® 25mg/mL, Roche, Alemanha). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.2 Preparo dos implantes biodegradáveis de PLGA contendo dexametasona revestidos por nanofibras poliméricas de bevacizumabe

O processo de preparo dos implantes de PLGA contendo dexametasona revestidos com nanofibras carregadas de bevacizumabe apresenta duas etapas:

- Preparo do implante de PLGA contendo dexametasona;
- Revestimento do implante com uma ou duas camadas de nanofibras sendo que a primeira camada contém bevacizumabe.

Os implantes biodegradáveis contendo dexametasona foram preparados de acordo com as técnicas descritas na patente "*Biodegradable device for intraocular drug delivery*" (Silva-Cunha, et al., 2006; Fialho, 2006) e com o trabalho "*Manufacturing Techniques of Biodegradables Implants Intended for intraocular application"* (Fialho, et al., 2005).

O PLGA 50:50 foi utilizado como matriz polimérica e o acetato de dexametasona como fármaco. Os implantes foram obtidos pela técnica de moldagem à quente. O sistema desenvolvido apresenta-se com 27,7% m/m de acetato de dexametasona, equivalente a 25% m/m de dexametasona e 72,3 % m/m de polímero. O polímero e o fármaco foram dissolvidos em uma mistura de acetonitrila e água purificada em temperatura ambiente, em seguida foram congelados a -80ºC e liofilizados por 24 horas (Liofilizador da marca Chist, modelo Alfa LD plus, Alemanha) para a obtenção de uma mistura homogênea. A mistura de pós foi moldada em forma de bastões utilizando uma espátula de

plástico e uma placa metálica com superfície antiaderente aquecida na temperatura de 100°C a 120°C. Após moldagem os implantes foram passados através de um uma cânula transescleral (trocar) de 25 gauge de diâmetro, garantindo assim a sua espessura máxima de 0,4mm.

A etapa seguinte refere-se ao revestimento do implante com nanofibras. Inicialmente o implante recebeu apenas uma camada de nanofibras polimérica de PVA contendo bevacizumabe na concentração de 2,7% m/m). Posteriormente, após o revestimento com nanofibras contendo bevacizumabe, o implante recebeu uma segunda camada de nanofibras de PCL sem fármaco. Após o revestimento os implantes foram passados através de um trocar de 23 gauge de diâmetro, garantindo assim a sua espessura máxima de 0,5 mm que permitiria a implantação do dispositivo de forma intravítrea através de uma cânula de 23 gauge.

O preparo das nanofibras de PCL e de PVA foram realizados conforme descrito a seguir.

As nanofibras foram produzidas pela técnica de eletrofiação com o auxílio do equipamento de *electrospinning*, (INSTOR – Sistemas de Inspeção Robótica) (Figura 5), instalado no Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Figura 5 - Equipamento de eletrofiação

A solubilidade do PVA em água é resultante da capacidade do polímero de formar pontes de hidrogênio com água, e assim, quanto maior o grau de hidrólise, maior a solubilidade. O PVA com grau de hidrólise acima de 95% dissolve-se em água a 70ºC (Wang, et al., 2004). A solução de PVA (grau de hidrólise de 98-99%), na concentração de 12% m/v, foi preparada dissolvendo o polímero em água purificada na temperatura de 70ºC, durante 2 horas. O bevacizumabe (Avastin®) foi adicionado à solução de PVA em temperatura ambiente na concentração de 2,7% em massa de bevacizumabe por massa de PVA. A solução de PCL, na concentração de 15% m/v, foi preparada dissolvendo o polímero em ácido acético glacial na temperatura de 40ºC, durante 2 horas.

Para o preparo das nanofibras, a solução contendo o polímero foi transferida para seringa de vidro, a qual foi acoplada à uma bomba eletrohidráulica. A vazão e a voltagem aplicadas, bem como o diâmetro interno da agulha e a distância entre a ponta da agulha e o coletor aterrado variaram de acordo com o polímero

eletrofiado. Para ejeção da solução de PVA foi empregada agulha com diâmetro interno de 0,55 mm. A vazão aplicada foi de aproximadamente 1,7 mm/h e voltagem foi de +25kV. Foram preparadas nanofibras sem o fármaco e nanofibras com bevacizumabe. Para ejeção da solução de PCL foi também empregada agulha com diâmetro interno de 0,55 mm. A vazão aplicada foi de aproximadamente 2,5 mm/h e voltagem foi de +29kV. Para ambas as fibras, o disco coletor foi posicionado a uma distância de aproximadamente 15 cm medidos a partir da ponta da agulha.

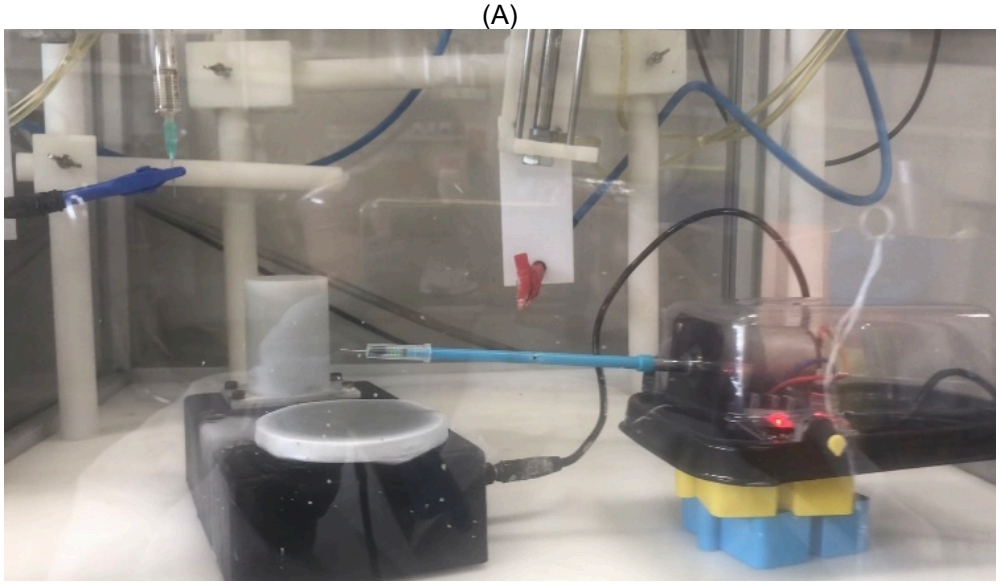
Para revestir o implante foi desenvolvido um aparato capaz de enovelar as fibras em torno do implante. O aparato (Figura 6A, 6B e 6C) é composto por um motor de corrente contínua, de tensão de 24V com controlador de velocidade que permite seu uso de 30 a 60 RPM. A este motor foi acoplado um adaptador que permite o encaixe do implante em sua extremidade. O dispositivo giratório foi regulado na velocidade de 30 RPM. O motor foi isolado em revestimento plástico a fim de não atrair as nanofibras para si, competindo com o disco coletor.

Os implantes de PLGA contendo dexametasona foram encaixados a esse aparato rotativo que foi posicionado no equipamento de eletrofiação permanecendo girando em torno do seu próprio eixo e acima do disco coletor. Dessa forma, esse obstáculo entre a agulha e o disco coletor foi capaz de coletar as nanofibras envolvendo-as ao entorno do implante.

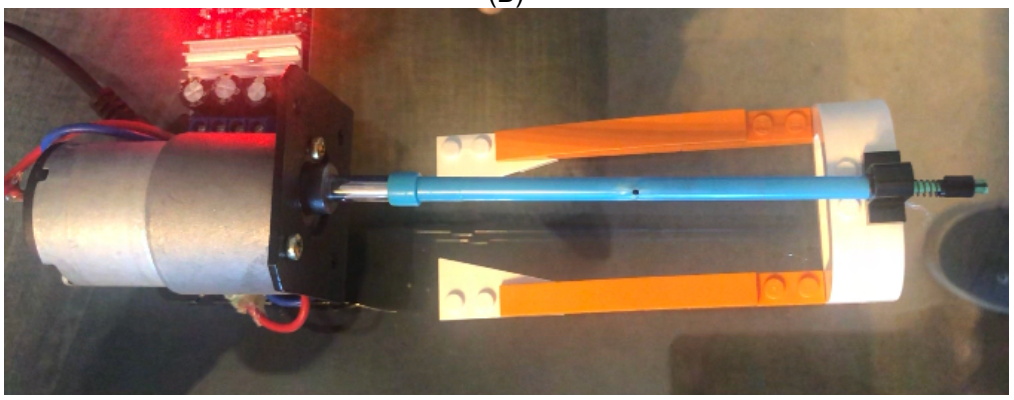
Para o revestimento da segunda camada de nanofibras de PCL, da mesma forma que na etapa anterior, os implantes poliméricos de PLGA contendo dexametasona revestido com nanofibras de PVA contendo bevacizumabe foram inseridos novamente no aparato giratório que permitiu o enovelamento da segunda camada de nanofibras em seu entorno.

O tempo de revestimento de um implante de cerca de 10 cm foi definido como o necessário para a ejeção de 1mL da solução contendo o polímero.

(A)



(B)



(C)

Figura 6 - A e B: Aparato disposto no aparelho de eletrofiação, C: Detalhes do aparato rotativo para revestimento dos implantes

Após revestimento os implantes foram acondicionados em um recipiente contendo dessecante (Figura 7) para manter a condição de baixa umidade e conservados em refrigerador (2 a 8ºC).

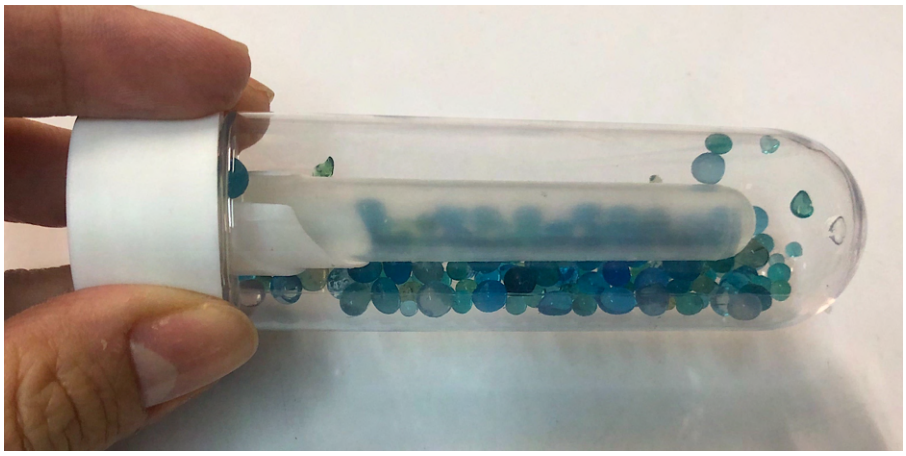


Figura 7 - Recipiente com sílica gel para armazenamento de implantes revestidos

Os implantes revestidos foram esterilizados por irradiação gama usando fonte de energia de cobalto 60 (MDS Nordion, Canadá) à temperatura ambiente. A dose aplicada foi de 15 kGy (Fernandes-Cunha, et al., 2017). Esse processo foi realizado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) localizado no *campus* da UFMG.

4.1.3 Caracterização dos implantes biodegradáveis contendo dexametasona revestido por nanofibras contendo bevacizumabe

4.1.3.1 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos sistemas desenvolvidos foi estudada em várias etapas do processo de preparo utilizando MEV em voltagem de 10kV e 15kV.

Foi avaliada a superfície dos implantes, a morfologia da nanofibra, a eficácia do revestimento com as nanofibras, bem como a espessura das nanofibras formadas.

Para a obtenção das imagens de microscopia, as amostras de implante foram cortadas e dispostas horizontalmente e verticalmente, possibilitando a visão de sua superfície e de uma parte da estrutura transversal dos implantes.

As amostras das malhas de nanofibras obtidas por eletrofiação no disco coletor foram cortadas com a ajuda de uma tesoura cirúrgica, nas dimensões aproximadas de 0,5 x 0,5 cm.

As nanofibras e os implantes foram colados sobre um suporte para amostra de microscopia (*stub*) com o auxílio de uma fita adesiva de carbono e em seguida metalizadas com uma camada de ouro. A superfície dos implantes foi visualizada em diferentes aumentos (30X a 370X) e a superfície das nanofibras foi visualizada nos aumentos de 3000x e 6000x.

As imagens foram adquiridas em aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura (marca Jeol, modelo JSM-6010 Plus – LA, Japão) e Metalizadora (marca Denton Vacuum, modelo Desk V, Estados Unidos da América) do Serviço de Recurso Vegetais e Opoterápicos da Funed.

4.1.3.2 Medidas de diâmetro das nanofibras obtidas

Os diâmetros das nanofibras foram medidos com auxílio do software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versão 1.52K, National Institute of Health, Estados Unidos das Américas, http://rsbweb.nih.gov/ij/). Para essas medidas foi utilizado a ferramenta de calibração de distância do software. Foram realizadas medidas em 100 fibras em cada uma das imagens. Os resultados são demonstrados como a média ± desvio padrão.

4.1.3.3 Estudo de Degradação in vitro

A degradação *in vitro* dos implantes revestidos foi monitorada por meio da medida da porcentagem de perda de massa e presença de nanofibras na superfície do implante por MEV.

Os implantes (n=3), previamente pesados, foram colocados em recipientes individuais e imersos em 5 mL de água sob condição *sink*. Este estudo foi realizado na incubadora com agitação constante de 50 rpm e sob temperatura de 37º±1°C.

Em intervalos de tempo pré-determinados (24h, 72h e 7, 14, 21, 28 e 35 dias) os implantes foram removidos e secados por 48 horas em um dessecador contendo sílica gel, mantido fechado à vácuo e sob temperatura ambiente. Em seguida, o peso seco final foi registrado e a porcentagem de perda de massa foi calculada pela equação: % perda de massa = (peso inicial – peso seco final) / peso inicial.

4.1.3.4 Estudo de liberação in vitro

O perfil de liberação *in vitro* dos implantes revestidos (n=3) foi realizado em 5 mL de água purificada sob condição *sink*. O estudo foi executado em incubadora com agitação constante de 50 rpm e sob temperatura de 37º±1°C. Em intervalos pré-estabelecidos (1h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h, 72h e 7, 14, 21, 28 e 35 dias), todo o meio foi amostrado e 5,0 mL de água purificada, mantida à temperatura, foram imediatamente adicionados a cada frasco de amostra. Com a finalidade de calcular a liberação de bevacizumabe e dexametasona, cada alíquota foi liofilizada. A quantificação dos fármacos liberados foi analisada pelo método de dosagem de proteínas Bradford (bevacizumabe) e por cromatografia líquida de ultra eficiência (dexametasona).

4.1.3.4.1 Quantificação de Bevacizumabe

Cada alíquota coletada foi ressuspendida em 2 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L (pH 8,0). A amostra foi purificada usando cromatografia de afinidade usando proteína G. As amostras coletadas foram aplicadas a uma coluna de cromatografia de proteína G Sepharose de 1mL e 0,1 mol/L Glicina-HCl (pH 3,0) foi usado como tampão de eluição. A aplicação da amostra, lavagem da coluna, eluição e equilíbrio da coluna foram por fluxo de gravidade. Após purificação a amostra foi diluída em 10 vezes e o teor de proteína foi determinado usando o método de ensaio de proteína de Bradford, cuja sensibilidade é 0,5 µg/mL e faixa de trabalho de 0,5 a 20 µg/mL. Simultaneamente à medição da concentração de bevacizumabe, foi realizada eletroforese SDS-PAGE para confirmar a integridade da proteína.

4.1.3.4.2 Quantificação de Dexametasona

Cada alíquota coletada foi ressuspendida em 500µL de acetonitrila. A quantidade de dexametasona liberada foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado à um detector de arranjo de iodo (Shimadzu, Nexera, Japão), usando água e acetonitrila (57:43) como fase móvel e uma coluna octadesilsilano (Zorbax Eclipse Plus C18, 150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm, Agilent, Estados Unidos da América). O fluxo foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção de 20 µL e detecção em 245 nm. Para garantir a linearidade do método, foram feitas curvas de calibração no intervalo de 0,2 a 0,002 mg/mL de dexametasona.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Preparo dos implantes

Os implantes de PLGA contendo dexametasona (I.Dexa), logo após o preparo pelo método de moldagem à quente, foram cortados com auxílio de bisturi, pesados e medidos com paquímetro. Os implantes de PLGA contendo dexametasona revestido com nanofibras de PVA carregadas com bevacizumabe (I.Dexa.Beva) e os implantes contendo dexametasona revestido com nanofibras de PVA carregadas com bevacizumabe e com segundo revestimento de nanofibras de PCL (I.Dexa.Beva.PCL) também foram cortados após o revestimento, pesados e medidos.

A segunda camada de revestimento com nanofibras de PCL foi realizada com o objetivo de melhorar o perfil de degradação do produto, retardando a solubilização da nanofibra de PVA e assim prolongando o tempo de liberação do fármaco.

Macroscopicamente, todos os I.Dexa apresentaram-se com aparência similar, como sistema monolíticos, lisos e com leve brilho. Os implantes revestidos (I.Dexa.Beva, I.Dexa.Beva.PCL) apresentaram-se como sistema monolíticos, aparência similares, não lisos e opacos (Figura 8).

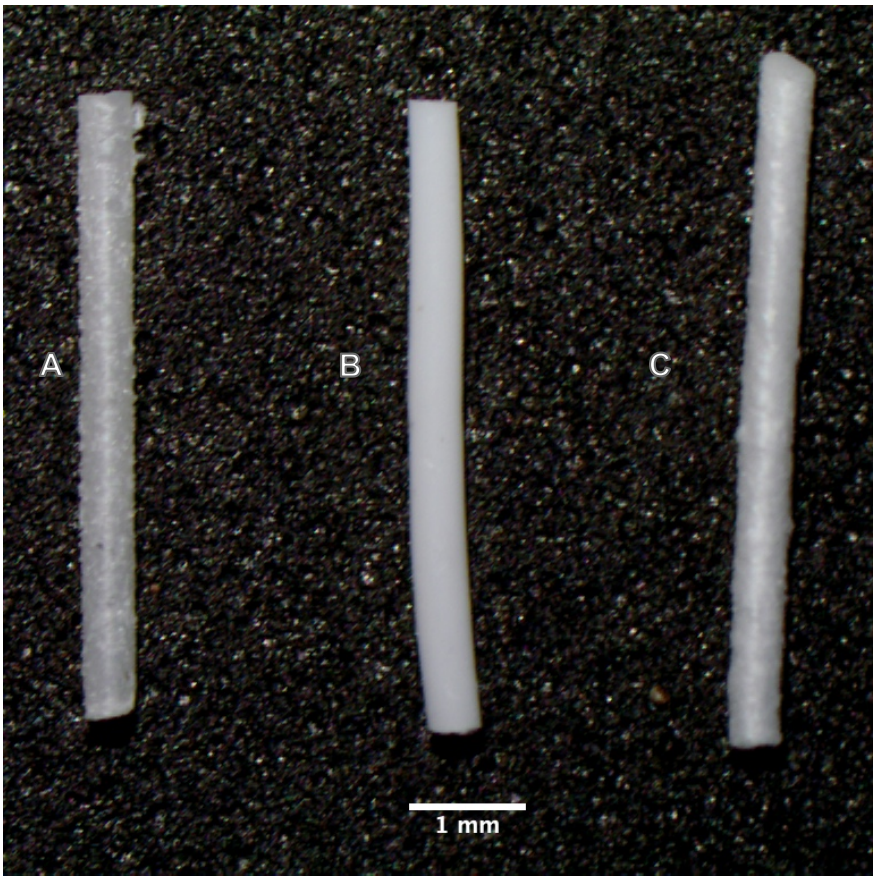


Figura 8 - Implantes de cerca de 6 mm de comprimento, em estereomicroscópio com aumento 1,2x, (A) I.Dexa.Beva,, (B) I.Dexa, (C) I.Dexa.Beva.PCL,

Os implantes I.Dexa, I.Dexa.Beva e I.Dexa.Beva.PCL preparados apresentaram dimensões de aproximadamente 6,0 mm de comprimento, 0,45 mm de diâmetro e peso-médio de 1,2±0,2mg, 1,4±0,2mg e 1,4±0,1mg, respectivamente.

Considerando que o instrumento de medicação disponível para realização do peso médio dos implantes era uma balança analítica, não observou-se ganho de massa significativo após o revestimento, nem mesmo entre a primeira e a segunda camada de revestimento, pois a variação de peso está na faixa de erro da medição.

4.2.2 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 9 e 10, respectivamente, representam fotomicrografias do implante de PLGA com dexametasona (I.Dexa) logo após o preparo e do implante revestido com nanofibra de PVA contendo bevacizumabe (I.Dexa.Beva) e com uma segunda camada de nanofibras de PCL (I.Dexa.Beva.PCL).

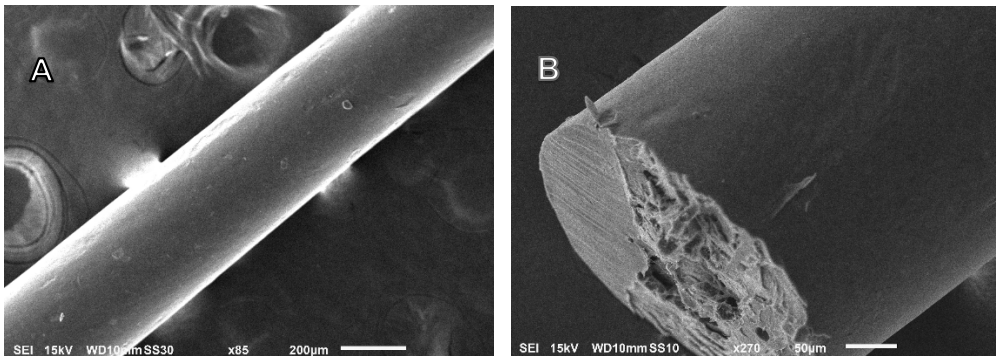


Figura 9 - Fotomicrografias dos implantes biodegradáveis intravítreos sem revestimento. (A) aumento de 85X e (B) aumento de 270X.

As fotomicrografias dos implantes I.Dexa e dos implantes revestidos (I.Dexa.Beva e I.Dexa.Beva.PCL) ilustram diferenças visuais significativas na morfologia da superfície. O I.Dexa apresentou uma superfície uniformemente lisa (Figura 9) e o I.Dexa.Beva e I.Dexa.Beva.PCL apresentaram ao seu redor uma camada irregular referente ao revestimento com nanofibras a qual apresenta-se com várias camadas de fibras que entrelaçam ao redor do implante cilíndrico (Figuras 10A, 10B e 10C).

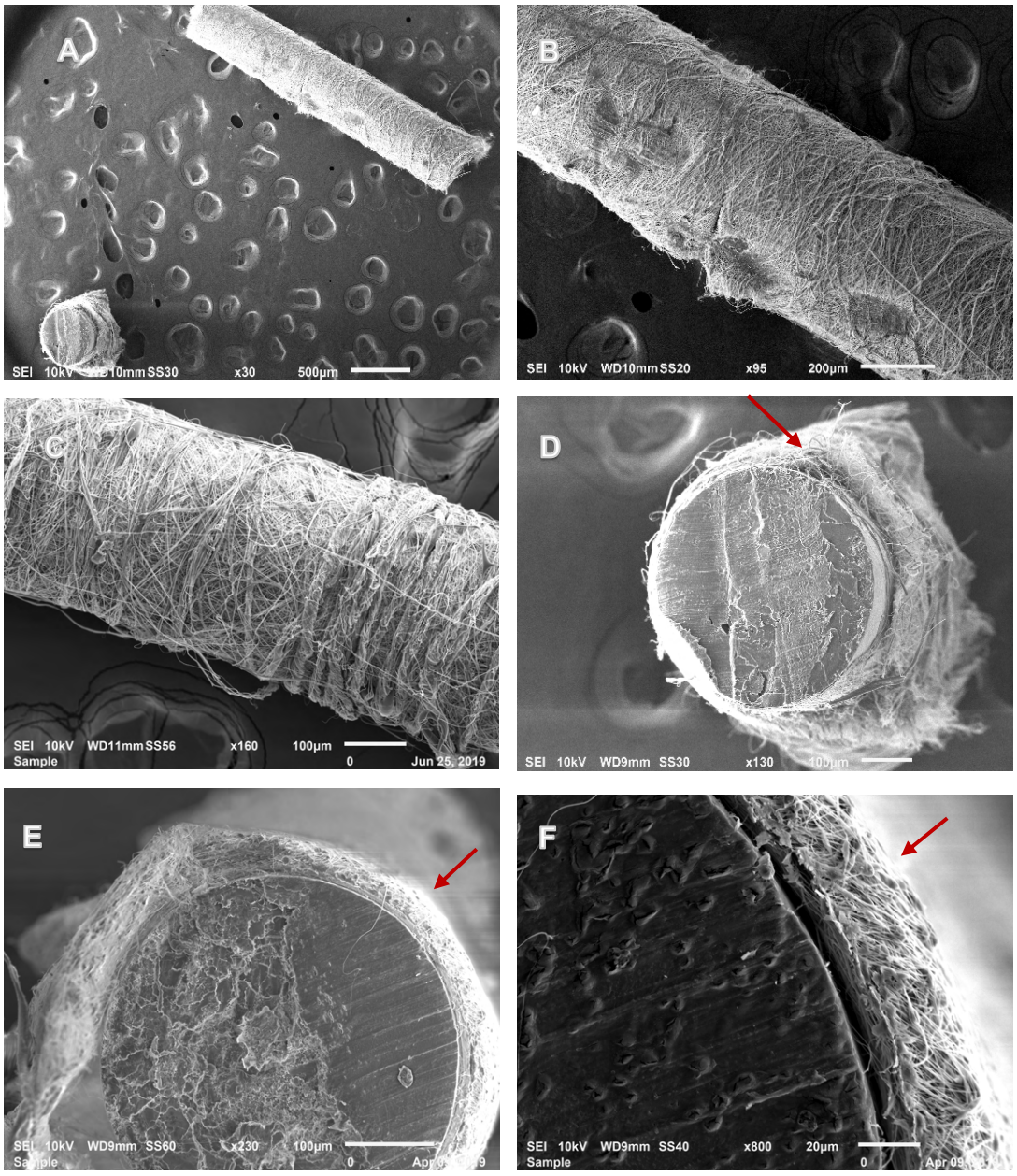


Figura 10 - Ultramicrografias dos implantes biodegradáveis intravítreos. (A) I.Dexa.Beva aumento de 30X, (B) I.Dexa.Beva superfície, aumento de 95X, (C) I.Dexa.Beva.PCL, aumento de 160X, (D) I.Dexa.Beva.PCL, corte transversal, aumento de 130X, (E) I.Dexa.Beva corte transversal, aumento de 230X, (F) I.Dexa.Beva.PCL, corte transversal, detalhe para visualização da camada de nanofibras aumento de 800X

Os cortes transversais (Figuras 10A e 10B) apresentaram irregularidades que foram causadas pelo corte com o bisturi. Ao seccionar os implantes, muitas vezes o revestimento sofre com o atrito da lâmina e por isso em algumas imagens, como na Figura 10D, o revestimento desprende-se de parte da

extremidade do implante. As Figuras 10E e 10F, evidenciam a aderência da camada de nanofibras ao implante.

Na Figura 11, observam-se diferentes tamanhos de nanofibras. As nanofibras de PCL e PVA apresentam diâmetros diferentes, sendo as nanofibras de PVA um pouco mais do dobro do diâmetro das de PCL. Sugere-se, portanto, nesse registro, a presença das duas nanofibras. Sendo a de PCL visualizada mais no primeiro plano, pois encontra-se na camada mais externa. Logo abaixo, visualizam-se nanofibras mais espessas, sugestivo da presença de nanofibras de PVA presentes na primeira camada de revestimento.

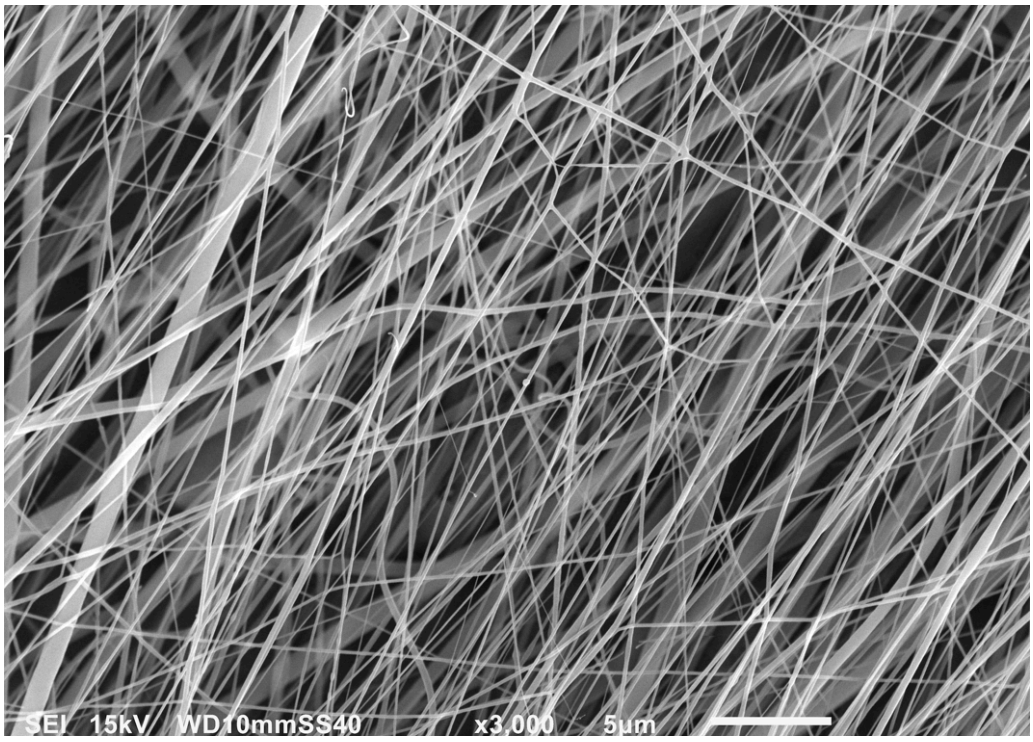


Figura 11 - Ultramicrografias da superfície do implante I.Dexa.Beva.PCL, presença de nanofibras de tamanhos diferentes (PCL e PVA)

4.2.3 Medidas de diâmetro das nanofibras

Beads ou contas são aglomerados poliméricos que podem se formar durante a eletrofiação e interferir nas propriedades das fibras produzidas (VenturellIl, et al., 2017).

A morfologia e diâmetro das fibras sofrem influências de diversos parâmetros da eletrofiação, principalmente as propriedades do próprio polímero (solubilidade, peso molecular e temperatura de transição vítrea), propriedades da solução de polímero (concentração, taxa de evaporação, viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica) e parâmetros do processo (velocidade de ejeção, tensão do campo elétrico, diâmetro da agulha, distância entre a agulha e coletor, umidade relativa do ambiente) (Greiner, et al., 2007; Ramakrishna S., 2005).

Produzir fibras livres de defeitos e sem falhas depende da regulagem da tensão superficial e taxa de evaporação do solvente, permitindo assim a interação entre polímero e solvente (Gonçalves, et al., 2015).

As nanofibras analisadas foram recolhidas no disco coletor durante a etapa de desenvolvimento, em que os parâmetros de eletrofiação foram definidos com objetivo de obter fibras bem formadas, aleatoriamente distribuídas e sem *beads*.

As imagens adquiridas (Figura 12) são de nanofibras de PVA contendo bevacizumabe obtidas em três dias de experimentos de forma a verificar a reprodutibilidade do método de obtenção. A variação entre as médias dos dias foi pequena demonstrando a capacidade do método de eletrofiação de reproduzir as condições experimentais (Tabela 2).

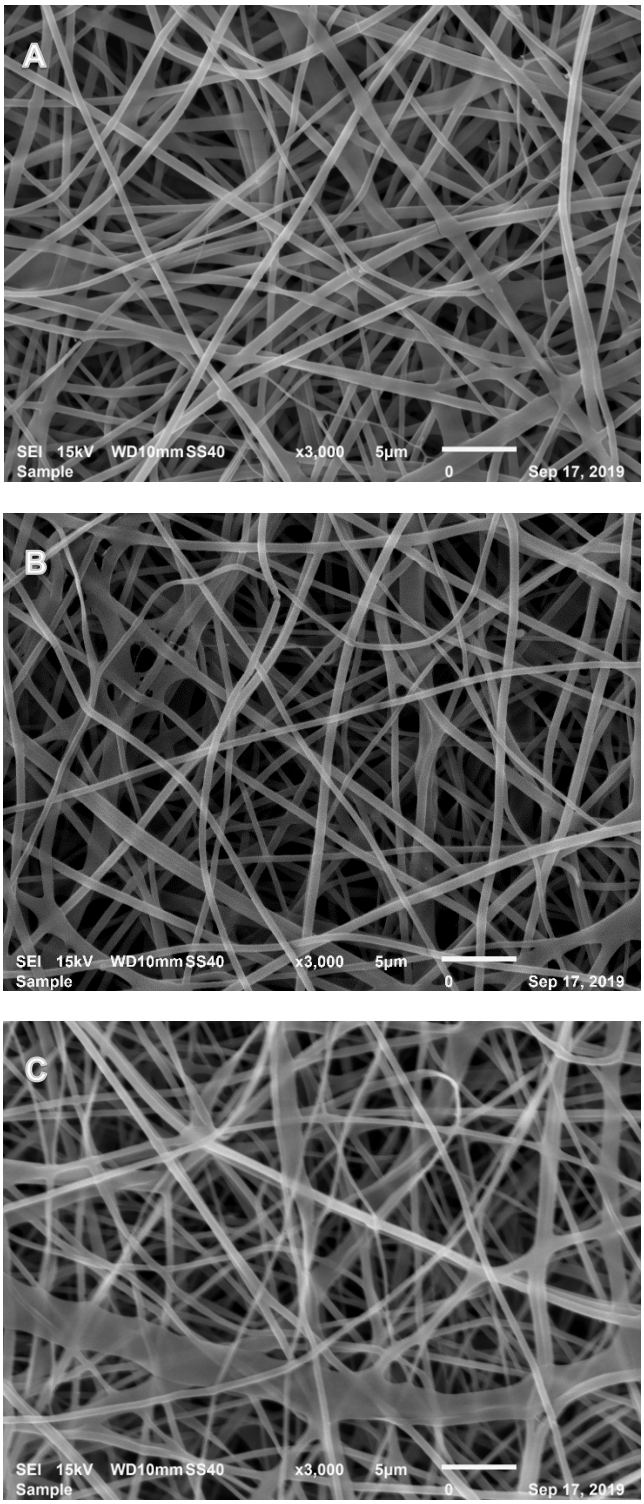


Figura 12 - Imagens MEV das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe depositadas no coletor do aparelho de eletrofiação (A, B, C), aumento de 3000x.

Tabela 2: Média dos diâmetros das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe

Experimento	Diâmetro nanofibra (nm)		
	Média	Valor mínimo	Valor máximo
1	487±129	207	804
2	451±82	223	629
3	430±80	224	600

As fibras de PVA com bevacizumabe apresentaram diâmetro médio de 456±102nm seguindo distribuição normal como demonstrado no histograma representativo (Figura 13).

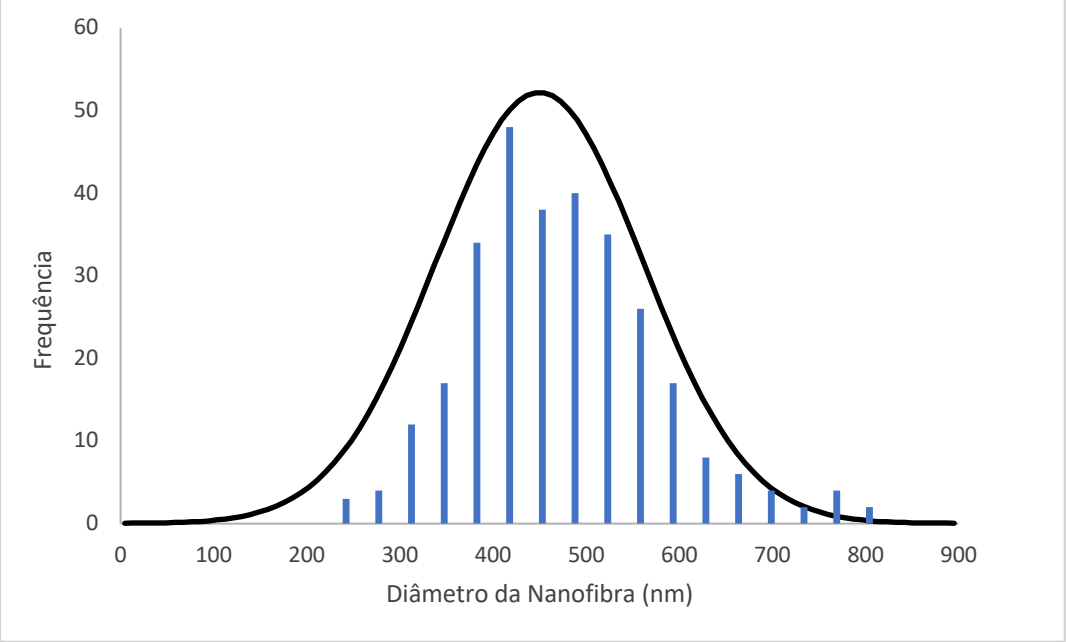


Figura 13 - Histograma representativo do diâmetro das nanofibras contendo bevacizumabe, n=300.

Foram adquiridas imagens no MEV referentes à nanofibras de PVA com bevacizumabe obtidas no processo de revestimento do implante. As fotomicrografias adquiridas (Figura 14) são também referentes a três dias de experimentos. E assim como no processo antes do revestimento, as fibras do revestimento do implante apresentaram pequena variação entre as médias dos três dias de experimento demonstrando a capacidade de reproduzir as condições experimentais. (Tabela 3).

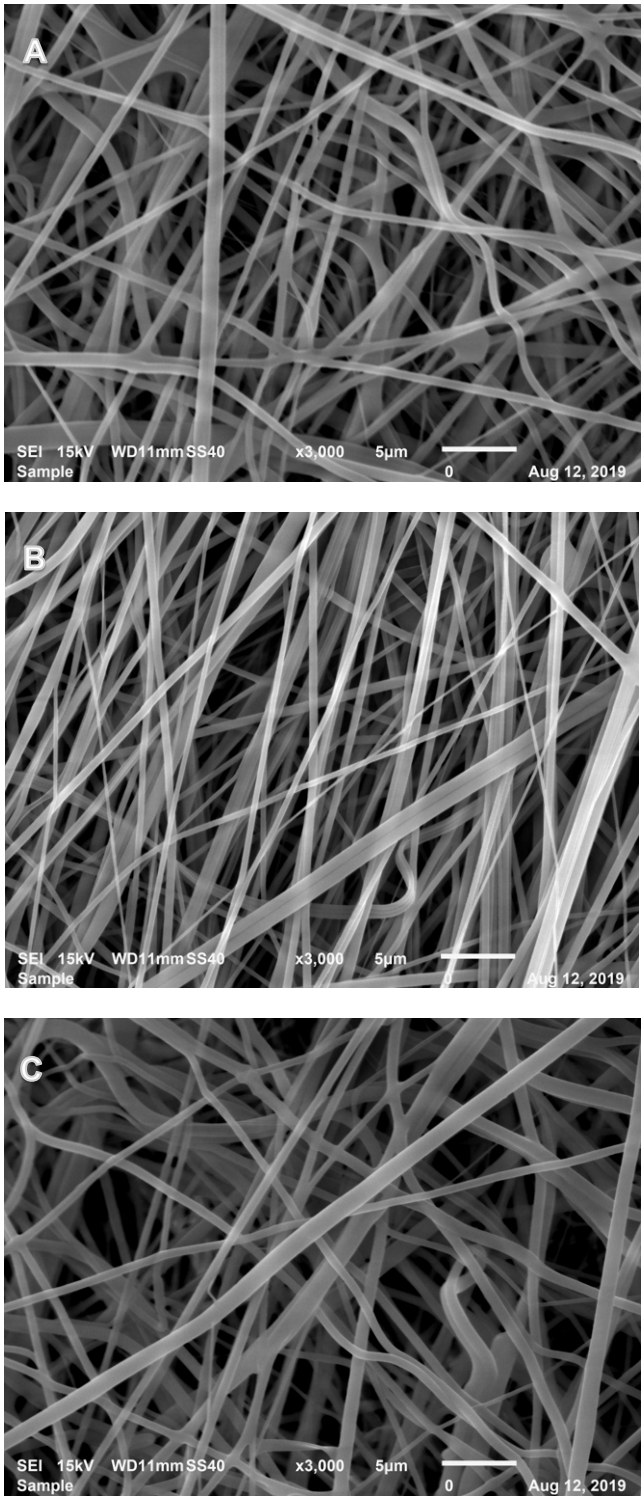


Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (aumento de 3000x) utilizadas para quantificação dos diâmetros das nanofibras contendo bevacizumabe da superfície do implante

Tabela 3: Média dos diâmetros das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe do revestimento do implante

Amostra por experimento	Diâmetro nanofibra (nm)		
	Média	Valor mínimo	Valor máximo
A	471±106	224	738
B	450±92	228	671
C	484±107	226	822

As nanofibras do revestimento do implante apresentaram diâmetro médio de 468±102nm, seguindo distribuição normal como demonstrado no histograma representativo (Figura 15).

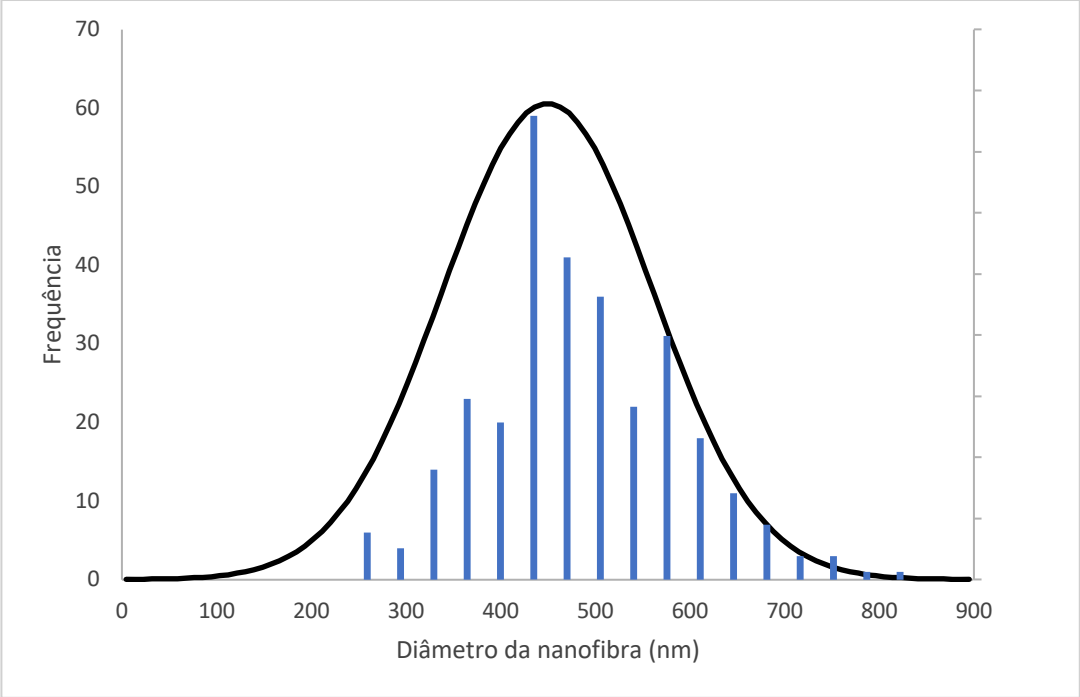


Figura 15 - Histogramas representativos do diâmetro das nanofibras contendo bevacizumabe do revestimento do implante, n=300.

A análise das médias dos diâmetros das nanofibras da manta e do revestimento do implante não são estatisticamente diferentes conforme demonstrado na Tabela 4 pelo teste t *Student* ($p<0,05$). O T estatístico é inferior ao T crítico e dessa forma temos que a hipótese nula deve ser aceita e, portanto, não há diferença significativa entre as médias testadas, demostrando assim que o

processo de revestimento do implante não gerou impacto no processo de obtenção das nanofibras.

Tabela 4: Análise das Média dos diâmetros das nanofibras de PVA contendo bevacizumabe do revestimento do implante e análise de variância das médias (test T de *Student*)

	Nanofibras no coletor (variável 1)	*Revestimento do implante (variável 2)*
Média	468	456
Desvio	102	102
Número de amostras	300	300
Grau de liberdade (n-2)	598	
T estatístico	1,46	
P(T<=t) bi-caudal	0,14	
t crítico bi-caudal	1,96	

A Figura 16 mostra imagens das nanofibras de PCL obtidas e que foram usadas na segunda camada de revestimento dos implantes. Assim como realizado com nanofibras de PVA, as fotomicrografias adquiridas são referentes a obtenção das nanofibras em diferentes dias de experimentos de forma a verificar a reprodutibilidade do método de obtenção das nanofibras. A variação entre as médias dos dias foi pequena demonstrando a capacidade do método de eletrofiação de reproduzir as condições experimentais (Tabela 5).

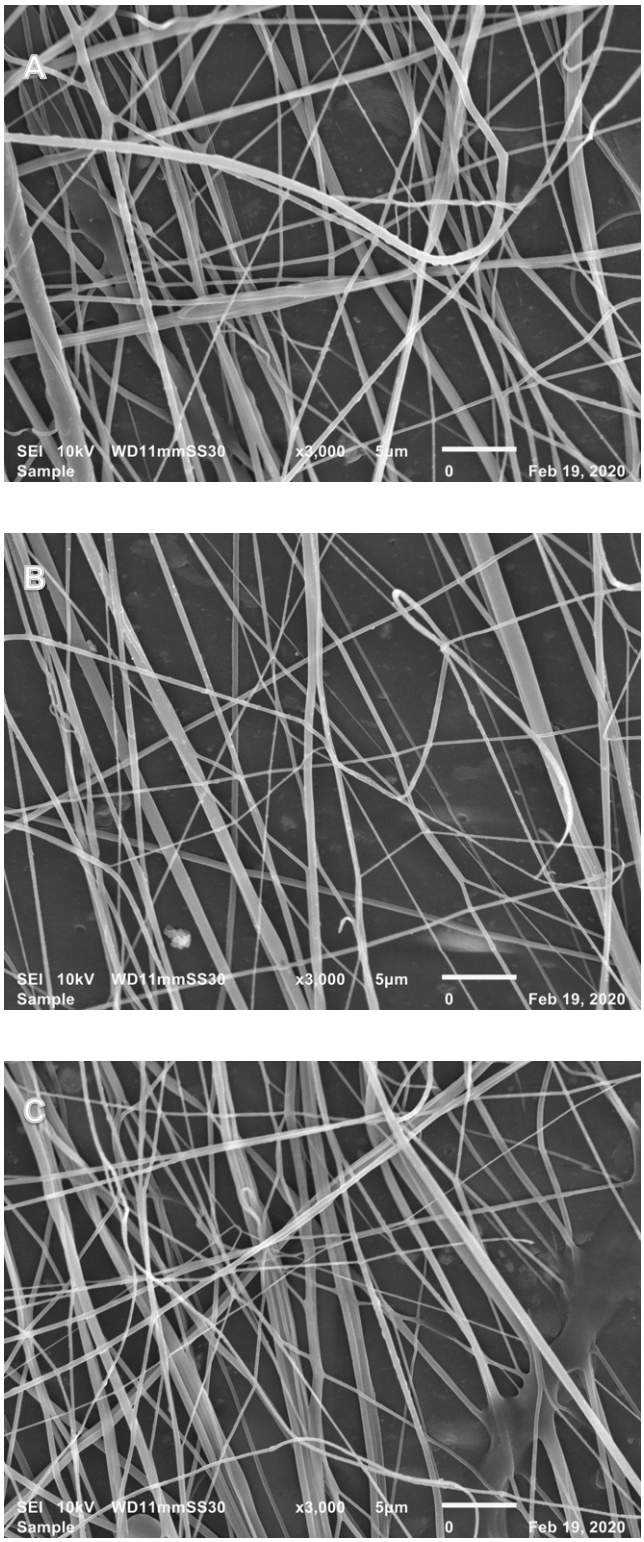


Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (aumento de 3000x) utilizadas para quantificação dos diâmetros das nanofibras de PCL

Tabela 5: Média dos diâmetros das nanofibras de PCL contendo bevacizumabe do revestimento do implante

Amostra por experimento	Diâmetro nanofibra (nm)		
	Média	Valor mínimo	Valor máximo
A	227±49	136	356
B	176±52	94	343
C	231±62	139	397

As nanofibras de PCL usadas no revestimento do implante apresentaram diâmetro médio de 211±61nm, seguindo distribuição normal como demonstrado no histograma representativo (Figura 17).

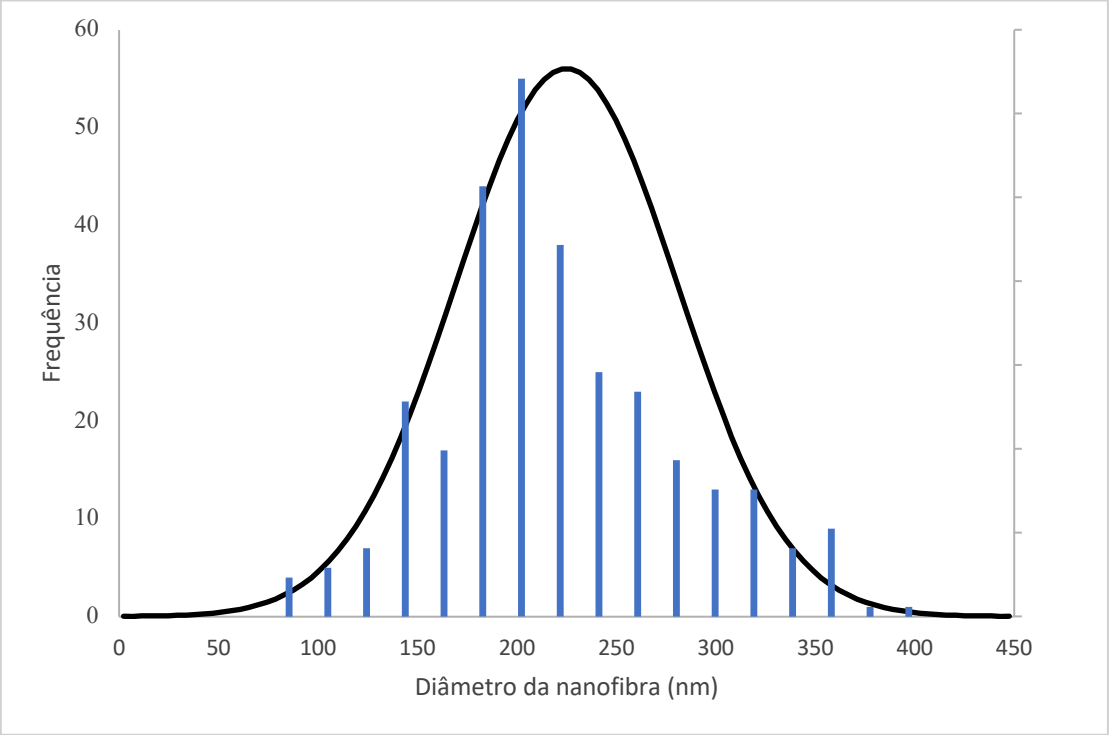


Figura 17 - Histogramas representativos do diâmetro das nanofibras de PCL no revestimento do implante, n=300.

Considerando que PVA foi solubilizado em água e o PCL em ácido acético, portanto, apresentam diferentes taxas de evaporações, viscosidade, era esperado a obtenção de nanofibras de PVA de maior diâmetro quando comparada às de PCL. Isso, principalmente, pois a solução de PVA aquosa evapora mais lentamente do que uma solução orgânica.

4.2.4 Estudo de degradação *in vitro*

Nesse estudo foram utilizados três polímeros sintéticos biodegradáveis (PLGA, PVA e PCL) com diferentes taxas de degradação e que sofrem degradação hidrolítica em meio aquoso (Silva-Cunha, et al., 2010). O PVA é um polímero hidrofílico que se degrada rapidamente em meio aquoso; o PCL um polímero com maior cristalinidade e maior hidrofobicidade que o PLGA e, portanto, de degradação mais lenta (Diaz, et al., 2014; Song, et al., 2018; Tsai, et al., 2018). Sendo assim, espera-se que o PVA seja o polímero com menor tempo para sua completa degradação, seguido pelo PLGA (matriz do implante) e pelo PCL.

O estudo preliminar de degradação realizado no implante revestido com apenas uma camada de nanofibras de PVA (I.Dexa.Beva), demonstrou, no 7º dia de experimento, que a nanofibra foi praticamente eliminada, não resistindo sobre a superfície do implante (Figura 18). Esse resultado era esperado devido às características hidrofílicas do PVA. No entanto, apesar das nanofibras não serem visualizadas macroscopicamente, não se pode afirmar que as nanofibras destacadas da superfície do implante degradaram por completo, podendo vestígios estarem presentes no meio.

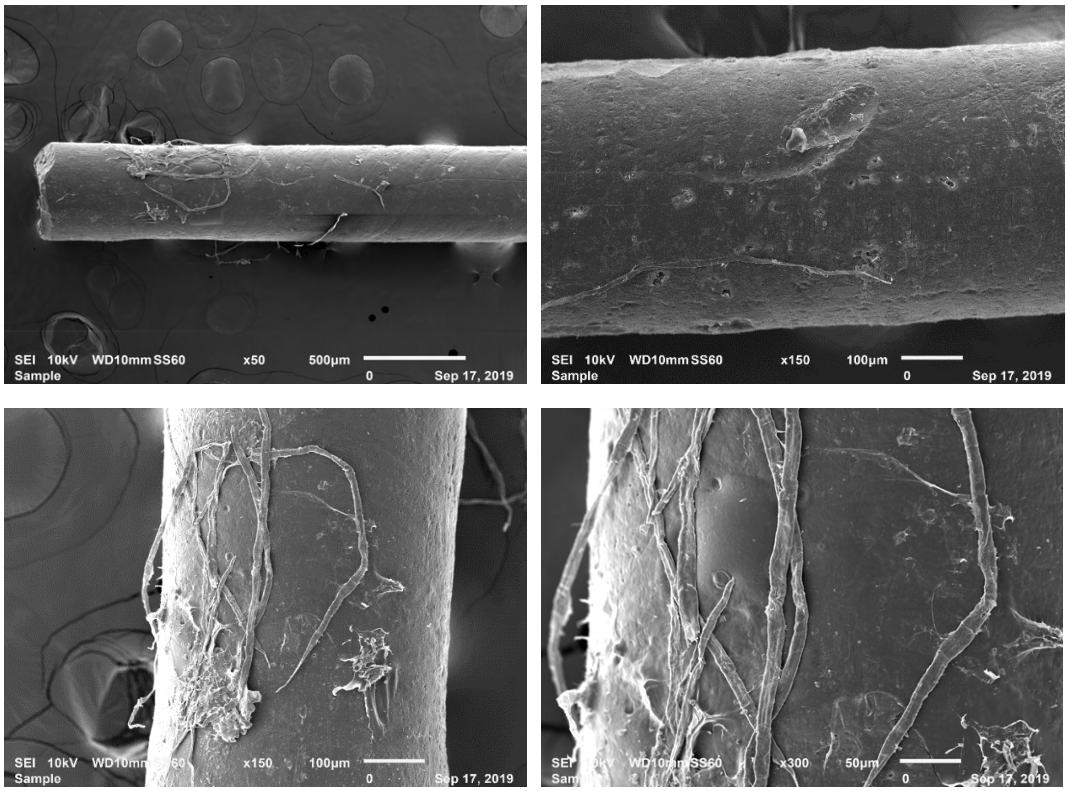
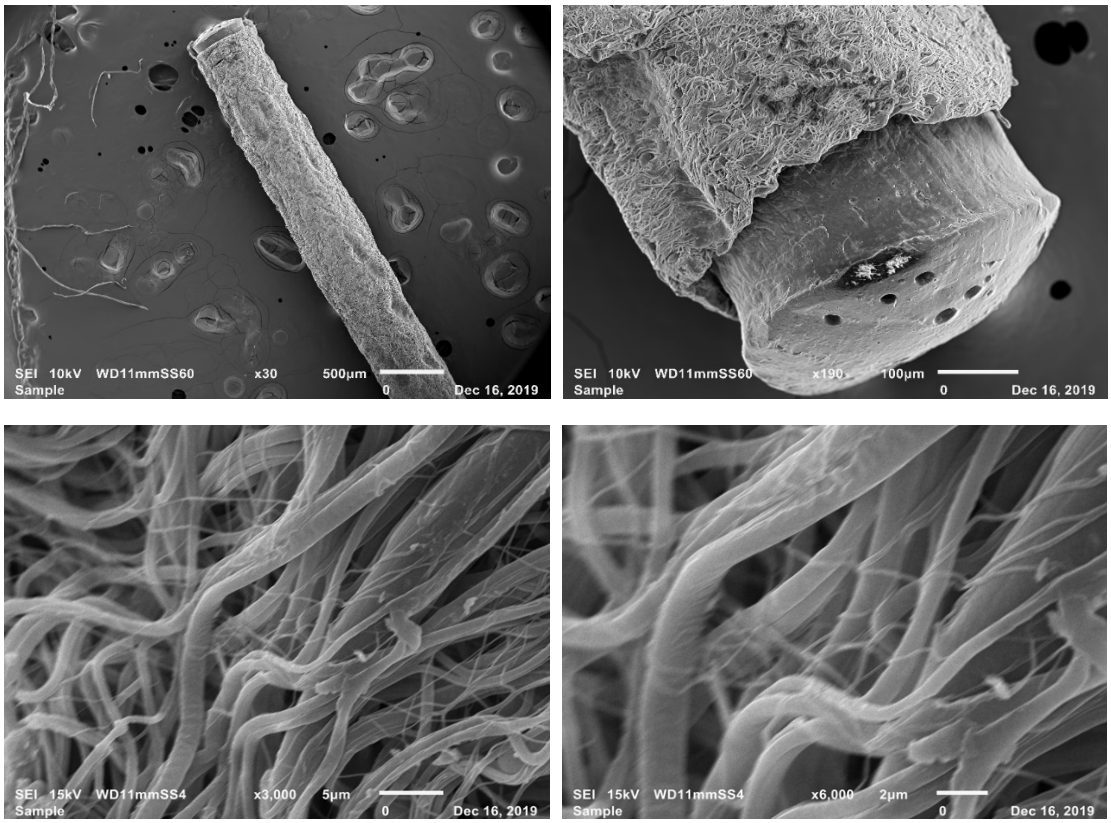


Figura 18 - Fotomicografias de I.Dexa.Beva após 7 dias de estudo de degradação *in vitro*

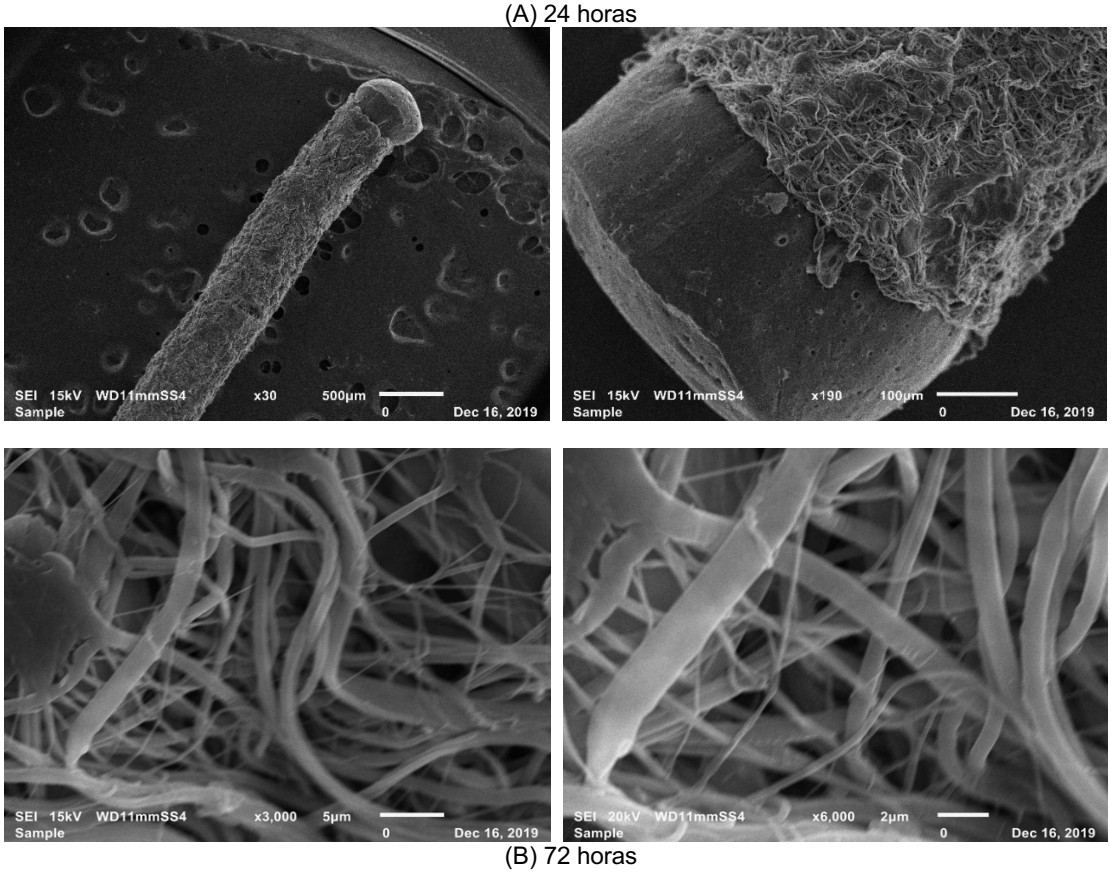
Considerando essa rápida eliminação das nanofibras de PVA e ainda que o PCL possui uma menor taxa de degradação quando comparado ao PVA, sugeriu-se o revestimento do implante com uma segunda camada de nanofibras. Assim, espera-se uma menor velocidade de liberação do anticorpo para o meio (Azabaryjani, et al., 2010; Shahla, et al., 2021).

A degradação dos implantes revestidos com as duas camadas de nanofibras, o I.Dexa.Beva.PCL, foi acompanhada pela determinação do perfil de perda de massa e pelas imagens obtidas por MEV para avaliação de suas superfícies em diferentes intervalos de tempo.

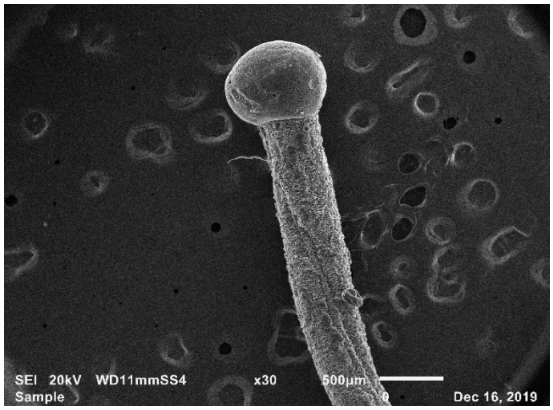
Os resultados obtidos com o I.Dexa.Beva.PCL foram evidenciados através da das fotomicrografias (Figura 19), nas quais é possível verificar a sua degradação mais lenta, de forma que até o 35º dia ainda observou-se a presença de nanofibras na superfície do implante.

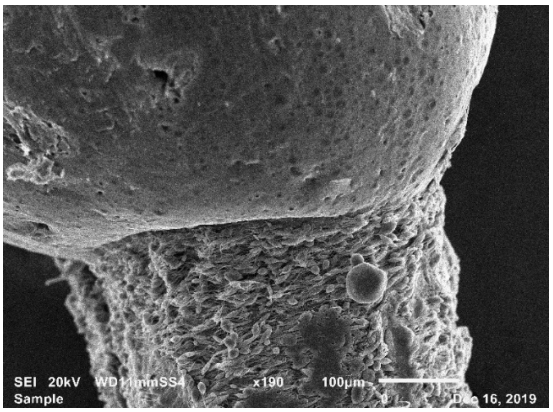


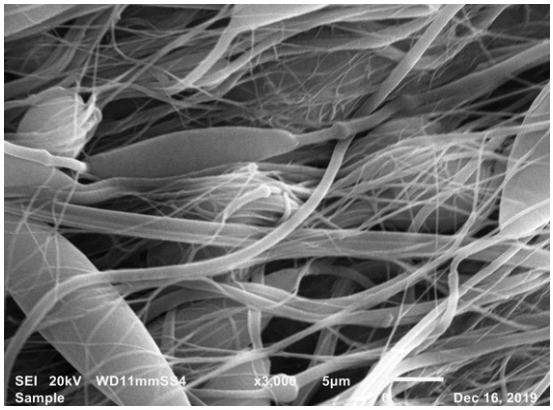
(A) 24 horas

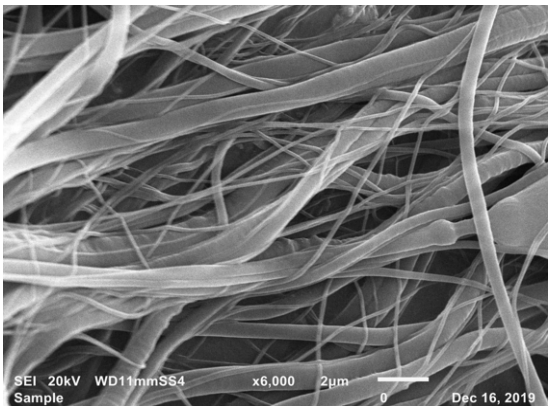


(B) 72 horas

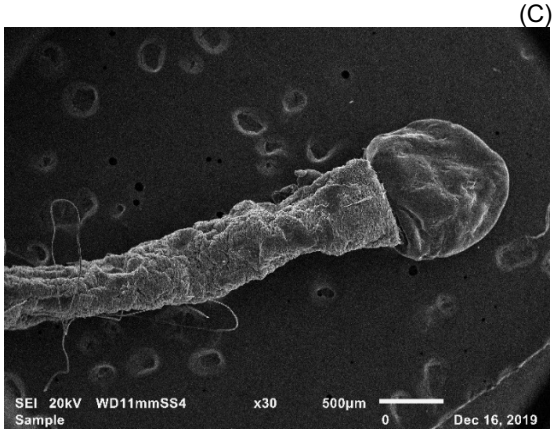


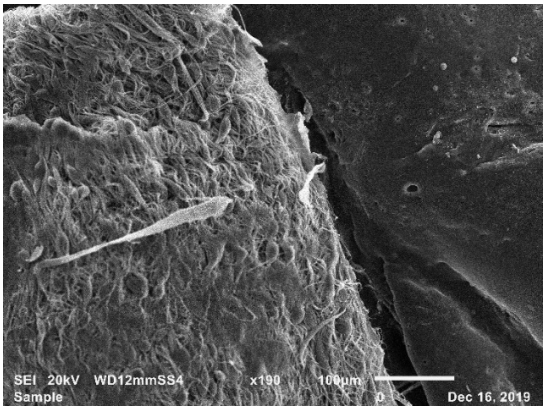


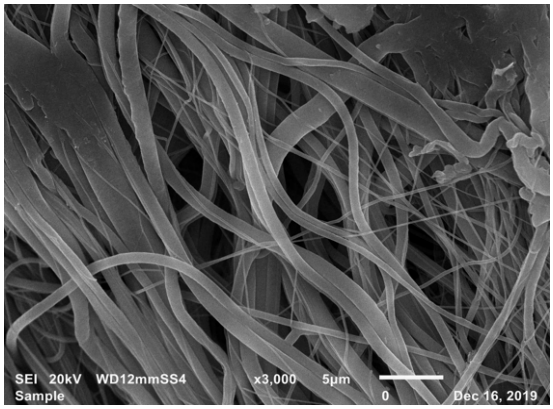


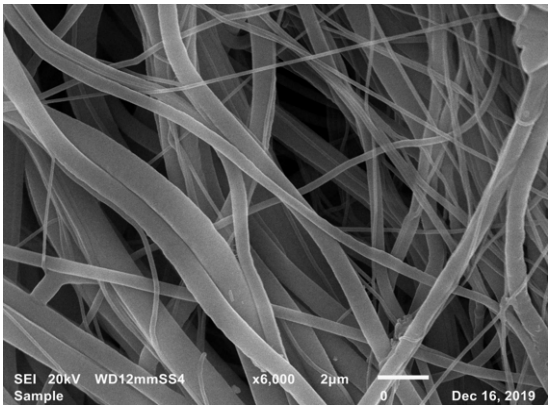


(C) 7 dias

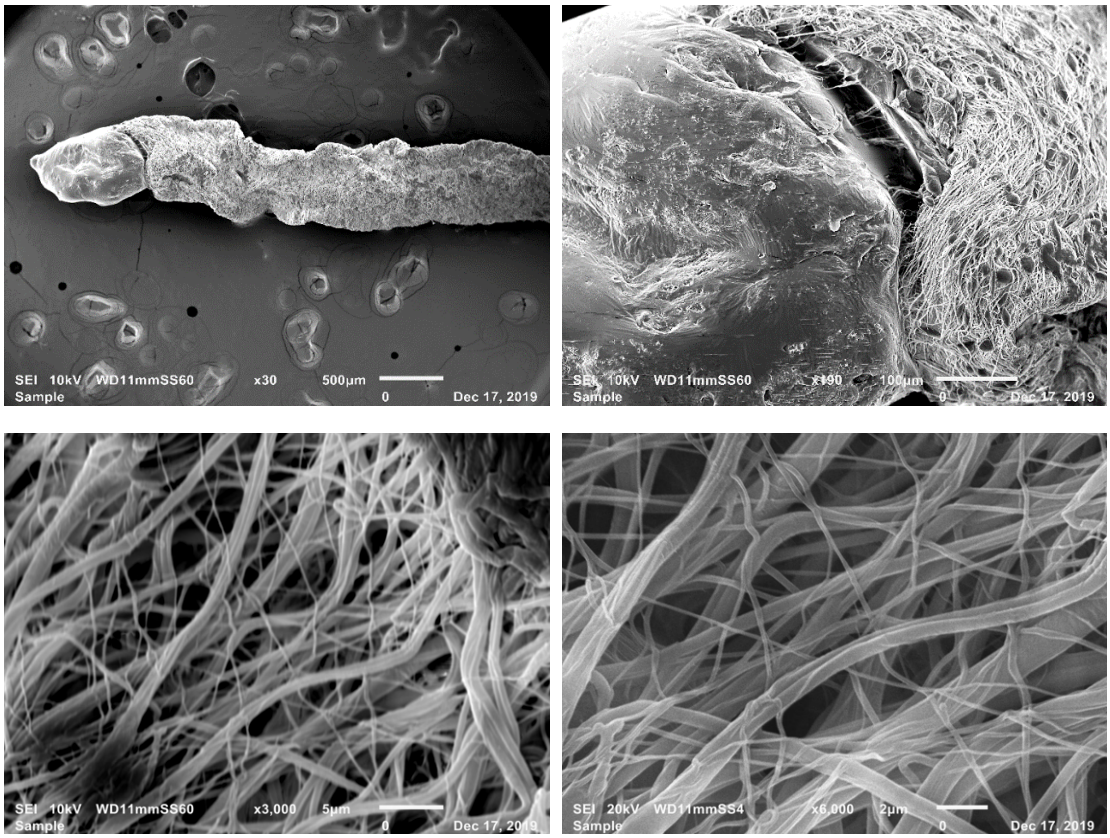




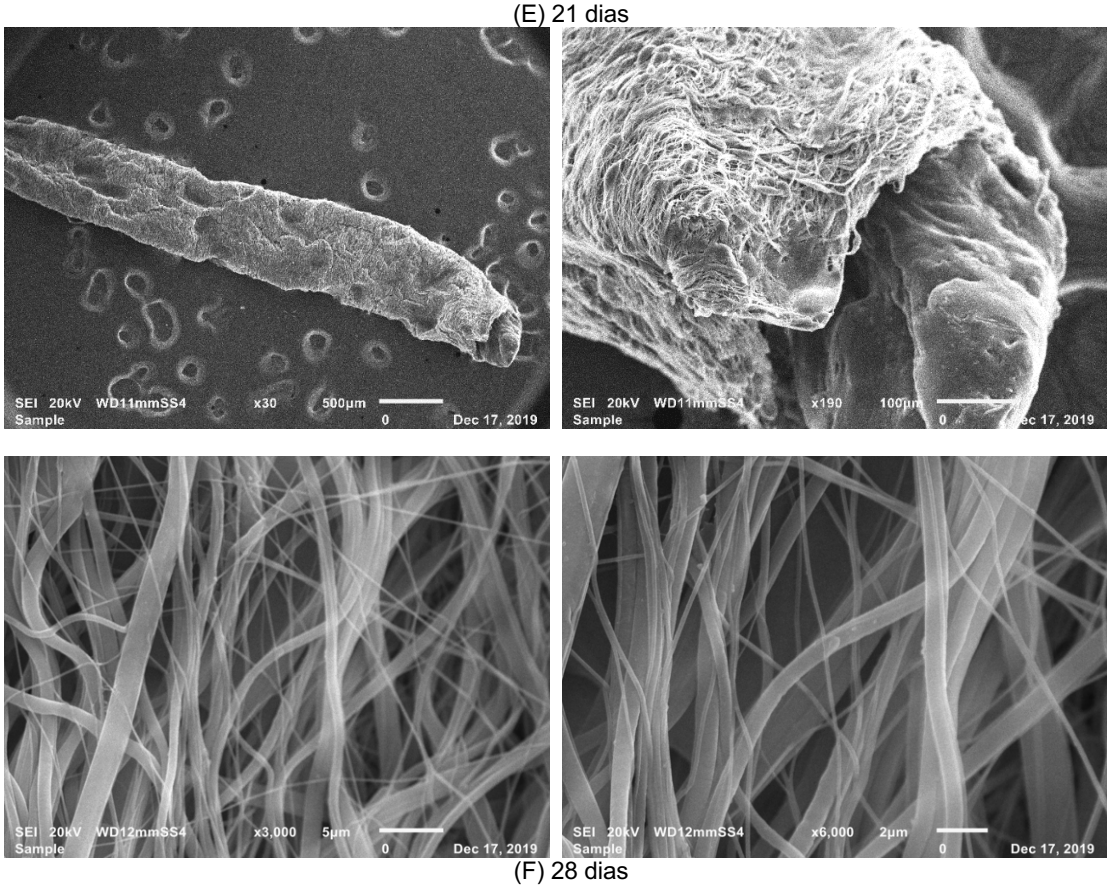




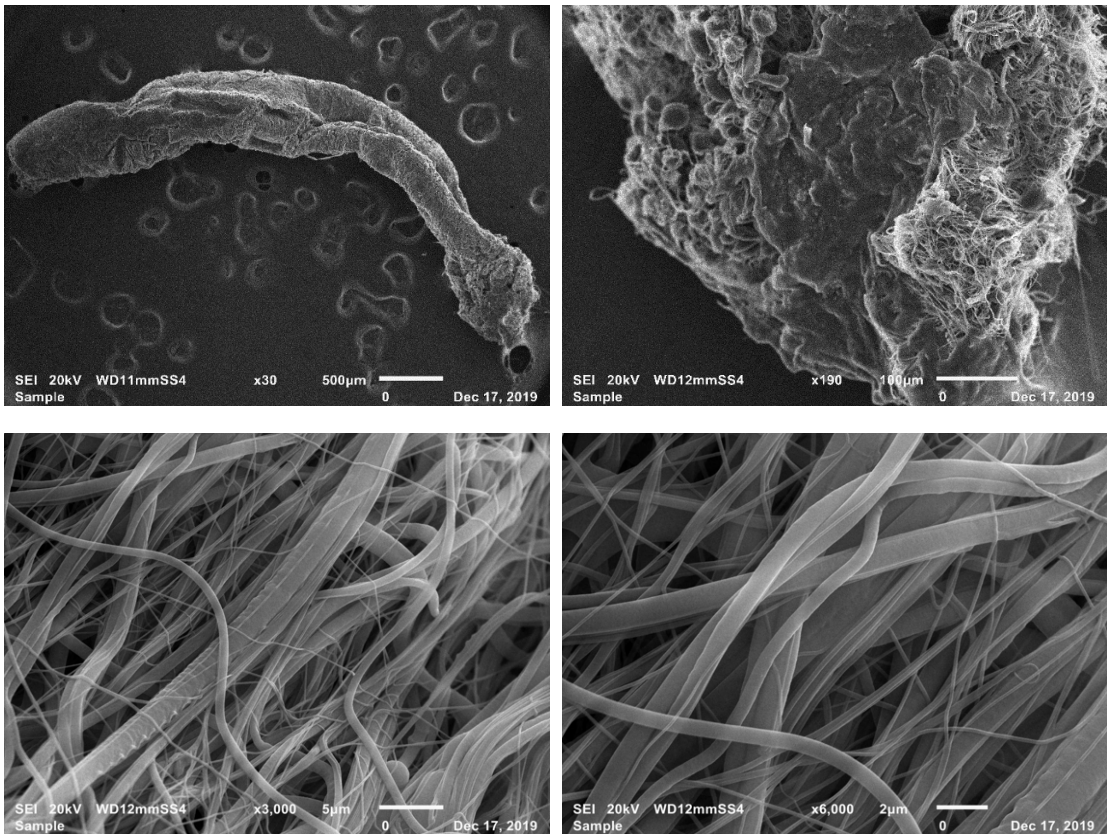
(D)14 dias



(E) 21 dias



(F) 28 dias



(G) 35 dias

Figura 19 - Fotomicrografias de I.Dexa.Beva.PCL durante estudo de degradação com aumentos de x30, x190, x3000 e x6000 em diferentes tempos: (A) 24 horas, (B) 72 horas, (C) 7 dias, (D) 14 dias, (E) 21 dias, (F) 28 dias, (G) 35 dias.

O Figura 20 mostra um perfil trifásico de perda de massa dos implantes em que, inicialmente, não há alteração significativa da massa dos sistemas, seguido de uma segunda fase com uma perda de massa mais rápida, indicada pela maior inclinação do gráfico, e uma terceira fase de redução de massa menos acentuada tendendo a um platô.

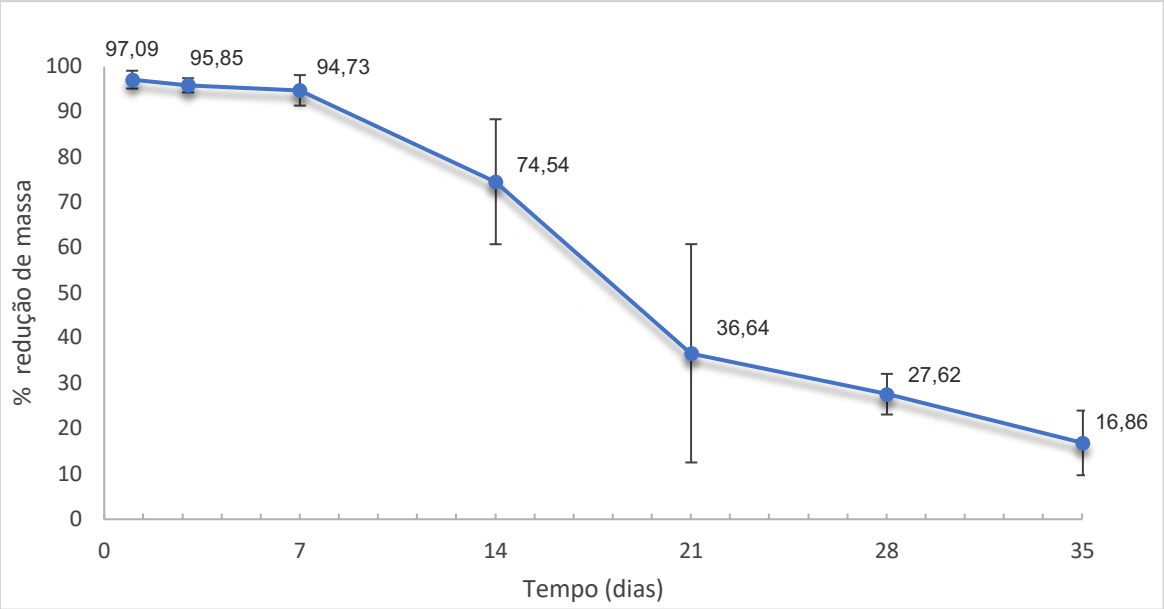


Figura 20 - Percentual de perda de massa dos implantes de PLGA revestidos com nanofibras (valores são representados com média ± desvio padrão, n=3)

Os implantes de PLGA sofrem erosão em sua massa na qual a absorção de água regula a taxa de degradação do polímero (Rothen-Weinhold, et al., 1999). Em um perfil trifásico, normalmente observado nesse tipo de sistema polimérico, a fase inicial é normalmente causada pela lenta penetração de água na matriz, causando uma pequena erosão e posteriormente, seguida pela hidrólise da cadeia polimérica e consequentemente uma maior degradação dessa matriz que é finalizada por uma terceira fase na qual ocorre uma perda de massa mais lenta (Witt, et al., 2000). A perda de massa observada no sistema é principalmente relacionada à matriz do implante, pois como verificado na avaliação de peso médio, a massa o implante de PLGA contribui mais para o peso final, sendo a contribuição do peso da nanofibra correspondente a um ganho de massa pouco significativo.

Para melhor entendimento da degradação do sistema ao longo do experimento, comparou-se o perfil de perda de massa com as imagens MEV dos implantes que demonstraram alterações na morfologia da superfície do sistema.

Até o 7º dia, observamos, na figura 20, uma pequena perda de massa. No entanto quando observamos as fotomicrografias desse período, notamos

diferença na aparência dos implantes quando comparado com as imagens antes do experimento (Figura 10); as nanofibras estão presentes em todas as imagens e não foi observado presença significativa de poros ou canais na matriz. Já no primeiro dia, observa o aumento do volume da matriz e o encurtamento da camada de nanofibras. Isso é mais evidenciado no 3º e mais ainda no 7º dia, onde nas imagens (Figura 19 - A, B e C) de menor aumento (30x e 190x) temos a impressão de que a camada de nanofibras está estrangulando a matriz. Nessas imagens também observa-se a presença de poros na matriz.

No 14º dia, também foi observada a presença de implante de PLGA com aumento de volume (Figura 19 D – aumento 30x e 190x), sendo contido pela camada de nanofibras e a presença de poros na matriz devido a hidrolise polimérica. No período do 14º e 21º dia, quando ocorre uma maior redução da massa do implante, observou-se nas fotomicrografias a degradação do polímero a partir dos canais e poros formados na matriz que permitem a entrada do meio aquoso. Nota-se também que a aparência do corpo do implante vai se apresentando cada vez mais deformada, evidenciando alterações significativas de tamanho e forma dos implantes.

Do 21º ao 35º dia, quando a perda de massa ocorre cada vez mais lenta, a morfologia dos implantes continua mudando significativamente, perdendo sua forma e tamanho iniciais. Já não mais visualiza-se a matriz polimérica. É importante observar que, apesar da degradação do implante de PLGA e da significativa perda de massa do implante ao longo do tempo, as nanofibras de PVA são visualizadas na superfície, sugerindo que a camada de nanofibras de PCL pode ter protegido o PVA da degradação.

E ainda, nas micrografias com aumento de 3000x e 6000x (Figura 19) de todos os tempos, observou-se a presença de dois tamanhos de nanofibras, como observada na superfície do implante antes do experimento (Figura 11). Sugerindo assim a presença de nanofibras de PCL (menor diâmetro) e PVA (maior diâmetro), o que corrobora com hipótese de que a nanofibra de PCL teve o papel de reter a nanofibra de PVA sobre a superfície do implante.

4.2.5 Estudo de liberação *in vitro*

Os ensaios foram realizados considerando que cada implante possui 0,3 mg de dexametasona e 10,8 µg de bevacizumabe.

4.2.5.1 Dexametasona

A liberação in vitro de dexametasona é apresentada na Figura 21.

Para garantir a linearidade do método, foram feitas curvas de calibração no intervalo de 0,2 a 0,002 mg/mL de dexametasona obtendo um coeficiente de correlação (r2) de 0,99989.

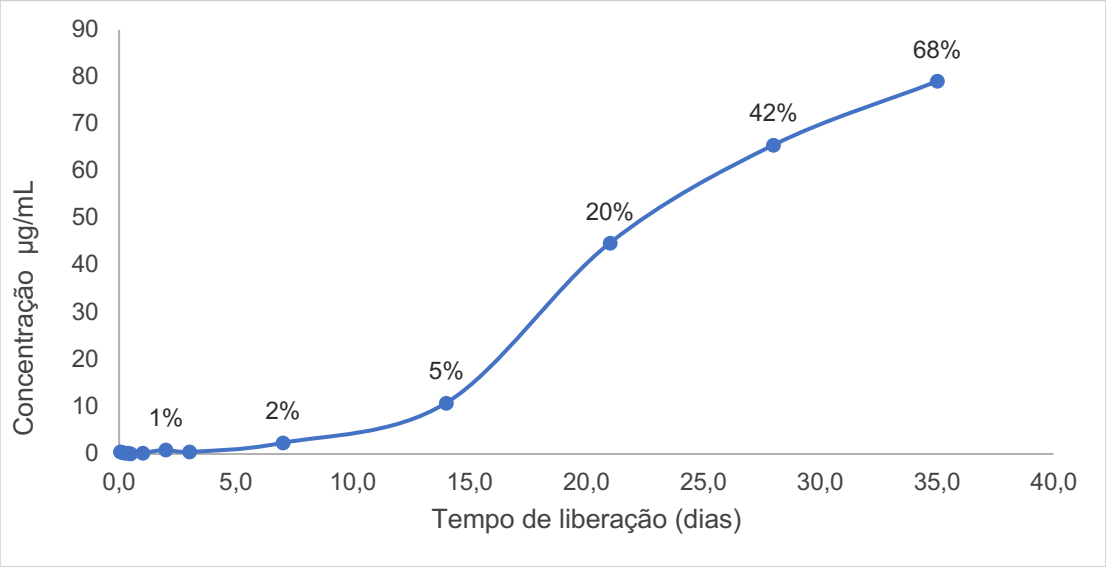


Figura 21 - Perfil de liberação *in vitro* (concentração x tempo) demonstrando o % acumulado de Dexametasona (n = 3).

A liberação de dexametasona é baseada na degradação da matriz PLGA e sua solubilização no meio. Na Figura 20, observou-se o início da degradação do implante em torno do 7º dia, sendo que no figura 21 foi verificado, entre o 10º e

15ºdia, o início da elevação da concentração do fármaco, o que nos leva a sugerir que a liberação do fármaco está relacionado aos poros e canais formados na matriz, que permitem a difusão do ativo para o meio (Fialho, et al., 2006). Aproximadamente 68% da dexametasona foi liberada em 35 dias, não sendo observado um *burst* inicial significativo que pudesse causar efeitos adversos nas estruturas oculares.

4.2.5.2 Bevacizumabe

A liberação *in vitro* do bevacizumabe é apresentada no Figura 22. A porcentagem de bevacizumabe liberada em 48 horas foi em torno de 90%. Vale ressaltar que não se esperava o mesmo perfil de liberação para bevacizumabe e dexametasona, pois eles foram incorporados em sistemas de liberação com características distintas e apresentam solubilidades diferentes. O bevacizumabe foi liberado mais rápido, como esperado, de forma controlada ao longo do tempo até 48 horas quando não foi mais detectado pelo método de análise utilizado.

Simultaneamente à medição da concentração de bevacizumabe, foi realizada eletroforese SDS-PAGE (Figura 23) para confirmar a integridade da proteína o que permitiu a visualização de algumas bandas de fragmentos de proteína, de tamanhos semelhantes, tanto no bevacizumabe quanto nas alíquotas coletadas no ensaio de liberação, sendo esse um indicativo da presença do bevacizumabe nas amostras.

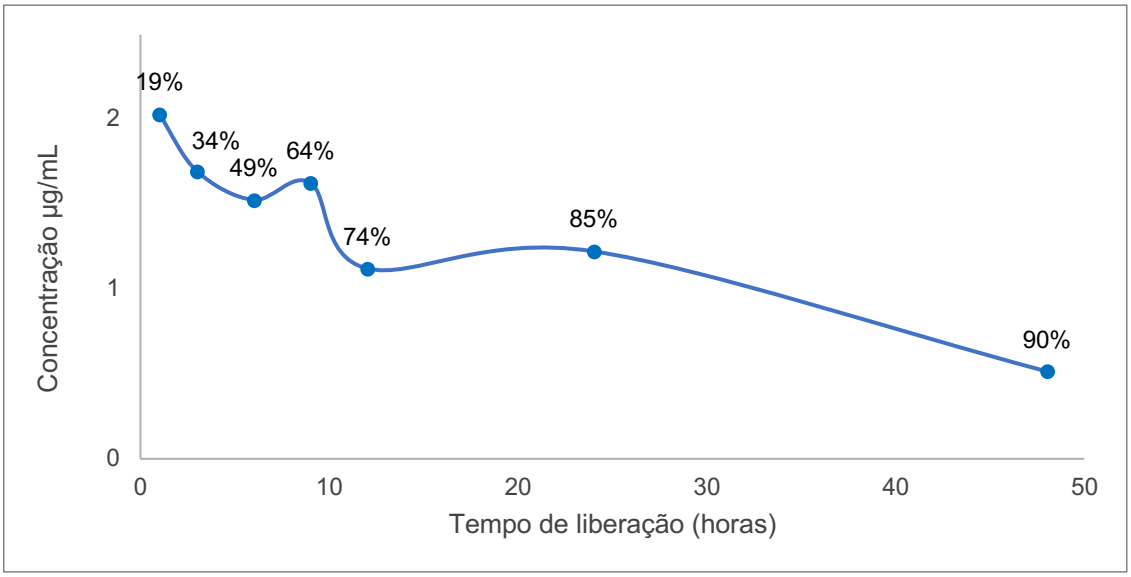


Figura 22 - Perfil de liberação *in vitro* (concentração x tempo) demonstrando o % acumulado de Bevacizumabe (n = 3).

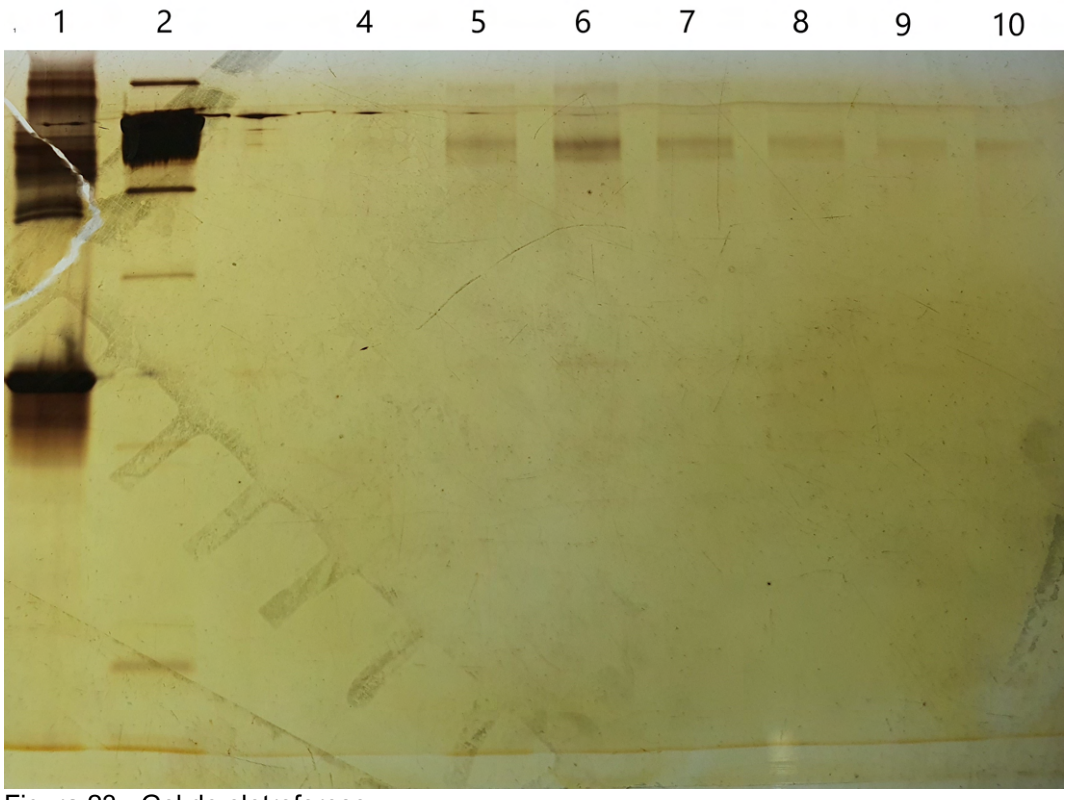


Figura 23 - Gel de eletroforese
1: Albumina 2: Bevacizumabe (Avastin®), 4 a 10: amostras do estudo de liberação

É importante reforçar que os implantes revestidos com nanofibras contendo dexametasona e bevacizumabe são vantajosas para o uso proposto, pois permitem a entrega de dois medicamentos em apenas uma administração, o que pode reduzir potenciais efeitos colaterais de administrações intravítreas frequentes e aumentar a adesão do paciente ao tratamento.

5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DOS IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS DE PLGA E DEXAMETASONA REVESTIDOS POR NANOFIBRAS CONTENDO BEVACIZUMABE

A atividade antiangiogênica dos implantes desenvolvidos foi avaliada através do teste em membrana corioalantóica (CAM) em ovos embrionados de galinha.

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Materiais

Ovos de galinha embrionados, bevacizumabe (Avastin® 25mg/mL, Roche, Alemanha), implante de dexametasona 0,3mg, implante de dexametasona 0,3mg revestido por nanofibras contendo 10,8 µg de bevacizumabe.

5.1.2 Métodos

O método da membrana corioalantóica de embrião de galinha (*chick embryo chorioallantoic membrane*) é um teste que pode ser utilizado para avaliação de angiogênese *in vivo*. Realizado no ovo embrionado da galinha (*Gallus gallus domesticus*), este método apresenta dentre as vantagens eleitas para realização desta técnica, o fato que *in ovo* há uma maior viabilidade dos embriões e a possiblidade de observação e reflexão das condições fisiológicas do animal sobre o processo de neovascularização, podendo também ser utilizado como um

ensaio de avaliação pré-clínico para sistemas de liberação de fármacos (Vargas, et al., 2007).

O modelo da CAM consiste no uso de uma membrana vascular fetal, a membrana corioalantóica, que é típica de ovos de aves fertilizados incubados.

A metodologia aplicada foi conforme a descrita em trabalhos anteriores (Fialho, et al., 2013; Ferreira, et al., 2017; Nowak-Sliwinska, et al., 2010). Para este estudo foram avaliadas as seguintes amostras: implantes biodegradáveis contendo dexametasona não revestidos, nanofibras poliméricas contendo bevacizumabe, implantes biodegradáveis contendo dexametasona e revestidos com nanofibras poliméricas contendo bevacizumabe e implantes biodegradáveis contendo dexametasona revestidos com nanofibras poliméricas contendo bevacizumabe contendo um segundo revestimento de nanofibras poliméricas de PCL. Para avaliação de interferentes das formulações, foram empregadas as mesmas amostras sem a incorporação de fármaco. Como controle negativo, os ovos foram abertos, mas não receberam nenhum tratamento. E como controle positivo foi aplicado 50 µl de bevacizumabe na forma de solução na concentração de 6,25 mg/mL (Quadro 2).

Quadro 2: Descrição dos grupos de amostra estudados

G1	Implante de PLGA com 0,3mg de Dexametasona + Nanofibra de PVA com 2,7% de Bevacizumabe
G2	Implante PLGA + Nanofibras (Placebo)
G3	Implante de PLGA com 0,3 mg de Dexametasona
G4	Nanofibras PVA com 2,7% de Bevacizumabe
G5	Solução Bevacizumabe (Controle Positivo)
G6	Controle Negativo
G7	Nanofibras PVA (sem fármaco)
G8	Implante de PLGA com 0,3mg de Dexametasona + Nanofibra de PVA com 2,7% de bevacizumabe + revestimento PCL

Os ovos de galinha fertilizados foram obtidos da Granja Rivelli (localizada em Mateus Leme, MG) no terceiro dia de desenvolvimento embrionário.

Os ovos foram incubados a temperatura e umidade controladas (37ºC e 60% de umidade relativa). Ainda no terceiro dia de desenvolvimento embrionário, realizou-se uma abertura de cerca de 2 cm^2 na casca do ovo, ao redor da câmara de ar, evidenciando a membrana interna da casca. Em seguida, aplicou-se 2 gotas de solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,4) sobre a membrana interna para facilitar a exposição da CAM já vascularizada (Chaves, et al., 2016). Após a retirada da membrana externa, a abertura do ovo foi fechada com fita adesiva transparente e o ovo foi então retornado para a incubadora. No quinto dia de desenvolvimento embrionário, as amostras foram aplicadas diretamente sobre a CAM. Em seguida, os ovos foram então novamente selados com fita adesiva transparente e colocados na incubadora. Como controle negativo, os ovos foram abertos, mas nenhuma substância ou formulação foram aplicadas; e, como controle positivo foi aplicado o bevacizumabe na forma de solução. O aspecto da CAM foi avaliado diretamente no ovo, com aumento de 1x, no sétimo (Figura 24) e no décimo dia de desenvolvimento embrionário, utilizando um estereomicroscópio acoplado a uma câmera digital (marca Olympus, modelo: SZ61, software: analySIS getIT – versão 5.1) que permitiu assim o registro das imagens.

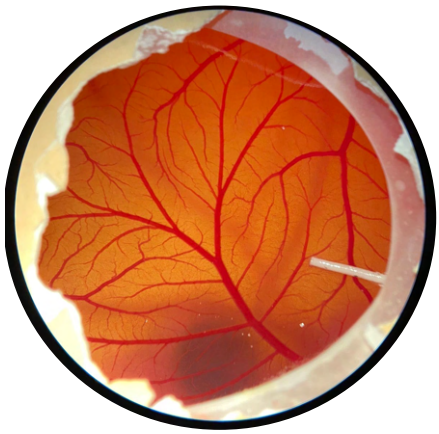


Figura 24 - Ovo no 7º dia de desenvolvimento embrionário com implante

Após a avaliação e registro das imagens, os embriões foram eutanasiados por hipotermia (Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal/CFMV, 2013), sendo expostos à 4ºC pelo mínimo de quatro horas (AVMA - American Veterinary Medical Association, 2020).

As imagens foram editadas para ajuste do contraste e transformação da imagem em preto e branco, possibilitando assim a medida da área ocupada pelos vasos através da quantificação dos pixels. A edição destas imagens foi realizada utilizando o software Image J (versão 1.52K, National Institute of Health, Estados Unidos das Américas).

Os resultados encontrados dos grupos experimentais foram comparados aos do grupo controle. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão e os pares de grupos de amostras (n=10) foram comparados usando o teste de T de *Student*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto *p-value* apresentava valores menor que 0,05 ($p < 0,05$).

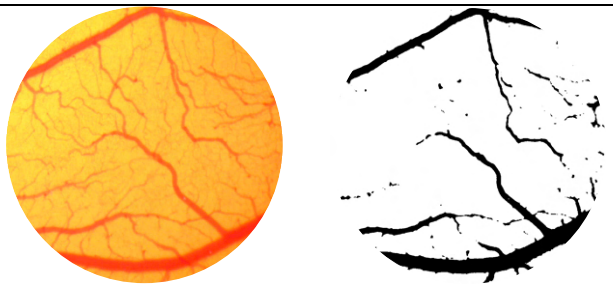
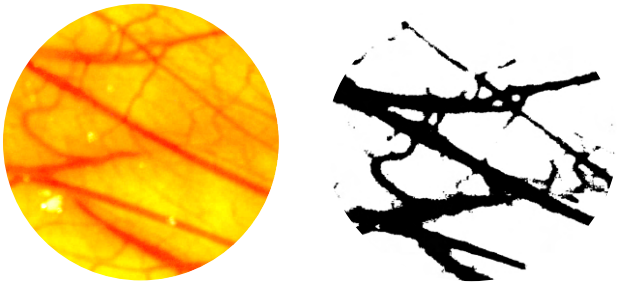
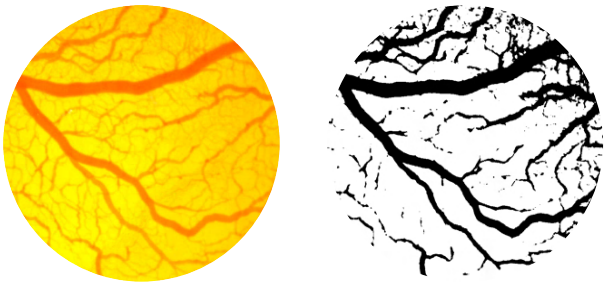
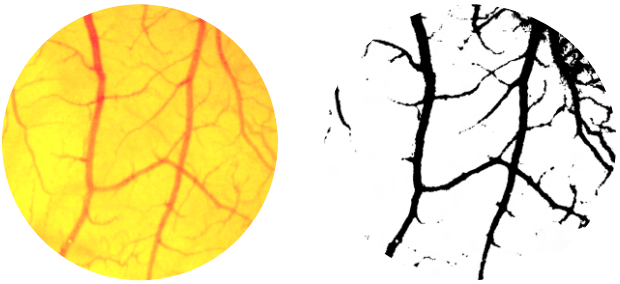
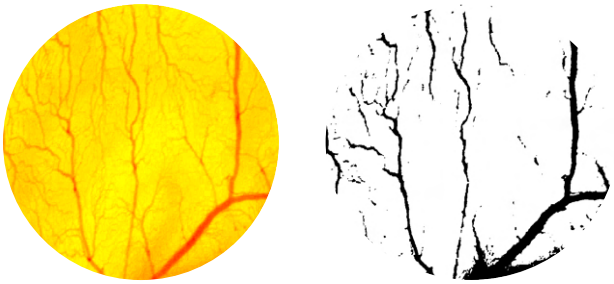
5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Avaliação da atividade antiangiogênica dos implantes biodegradáveis revestidos por nanofibras poliméricas em modelo de membrana corioalantóica

A membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM) é um modelo experimental *in* vivo que permite a visualização da angiogênese, pois trata-se de uma membrana extraembrionária que apresenta uma rede capilar muita fina em toda a sua superfície sendo naturalmente muito vascularizada. Sua formação ocorre entre o quarto e o sexto dia de desenvolvimento embrionário a partir da fusão das membranas córion e alantóide. A proliferação capilar na CAM inicia no

quarto dia e continua até o décimo segundo dia de desenvolvimento quando envolve o embrião em sua totalidade. Os vasos primitivos continuam a proliferar e diferenciar em um sistema arteriovenoso até o sexto dia, com proliferação rápida até o décimo primeiro dia. Após esse período, o índice mitótico reduz rapidamente e o sistema vascular atinge seu estágio final por volta do décimo oitavo dia, pouco antes da eclosão dos ovos (Ribatti, et al., 2000; Egoshi, et al., 2015). Sendo assim, entre o sexto e décimo primeiro dia, a membrana corioalantóica está pronta para responder aos estímulos pró ou antiangiogênicos. Esse modelo de teste *in vivo* apresenta vantagens como baixa complexidade de execução, baixo custo financeiro e alta taxa de reprodutibilidade (Egoshi, et al., 2015).

Considerando que até o sétimo dia a vascularização da porção central da CAM já se encontra totalmente desenvolvida e que após esse período a região periférica continua se desenvolvendo e expandindo, os registos fotográficos foram realizados buscando imagens da região menos central, livre dos vasos principais e de maior calibre. No entanto, nos ovos sem interferências de substâncias ativas (controle negativo e placebo), observou-se, que mesmo na região periférica, havia vasos mais calibrosos. A Figura 25 apresenta imagens representativas dos grupos estudados.

Descrição do Grupo	Imagem CAM
G1 - Implante dexametasona revestido com nanofibra de PVA contendo 2,7% de bevacizumabe	
G2 - Implante PLGA revestido com nanofibra de PVA (Placebo)	
G3 - Implante dexametasona	
G4 - Nanofibra de PVA contendo 2,7% de bevacizumabe	
G5 - Solução bevacizumabe (Controle positivo)	

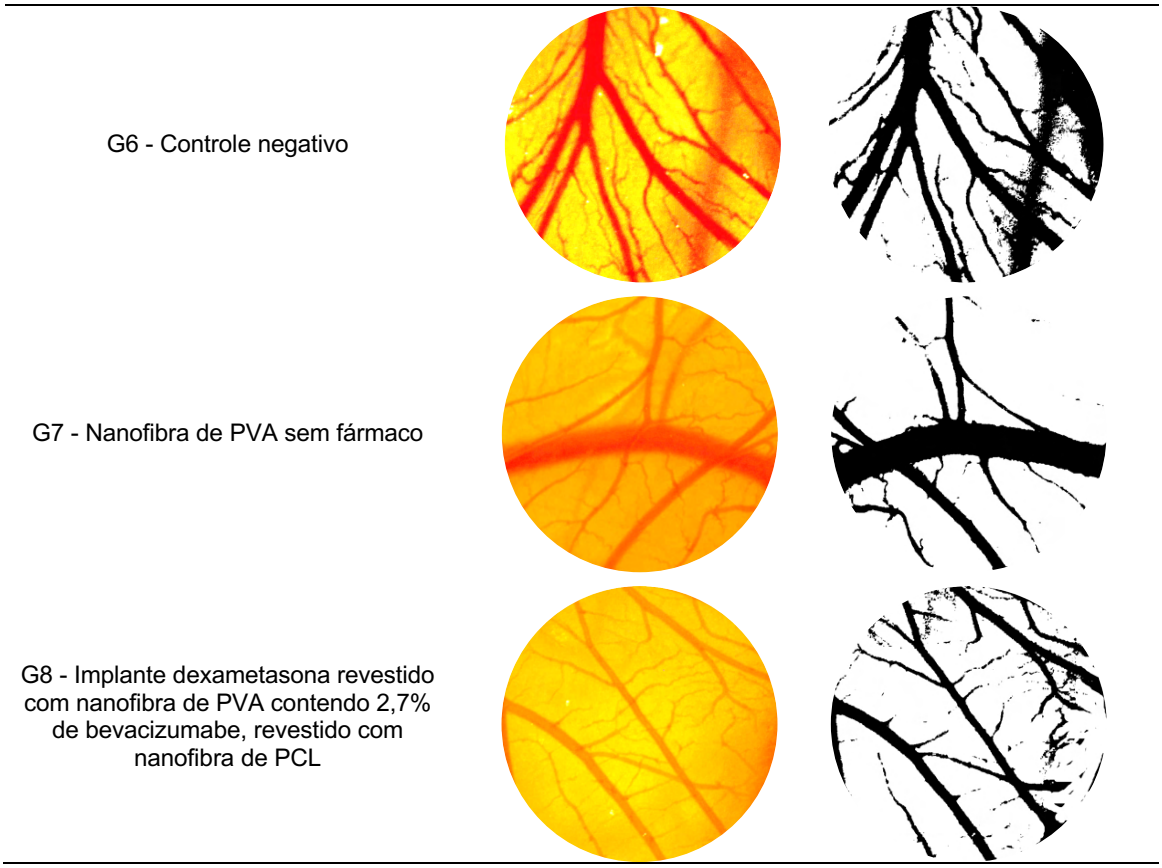
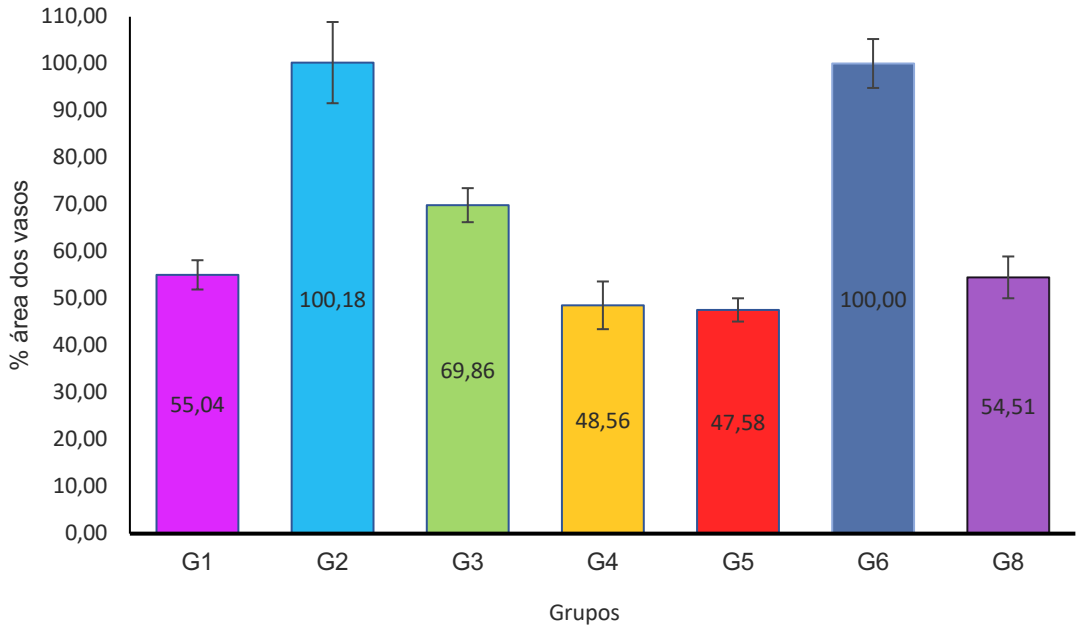


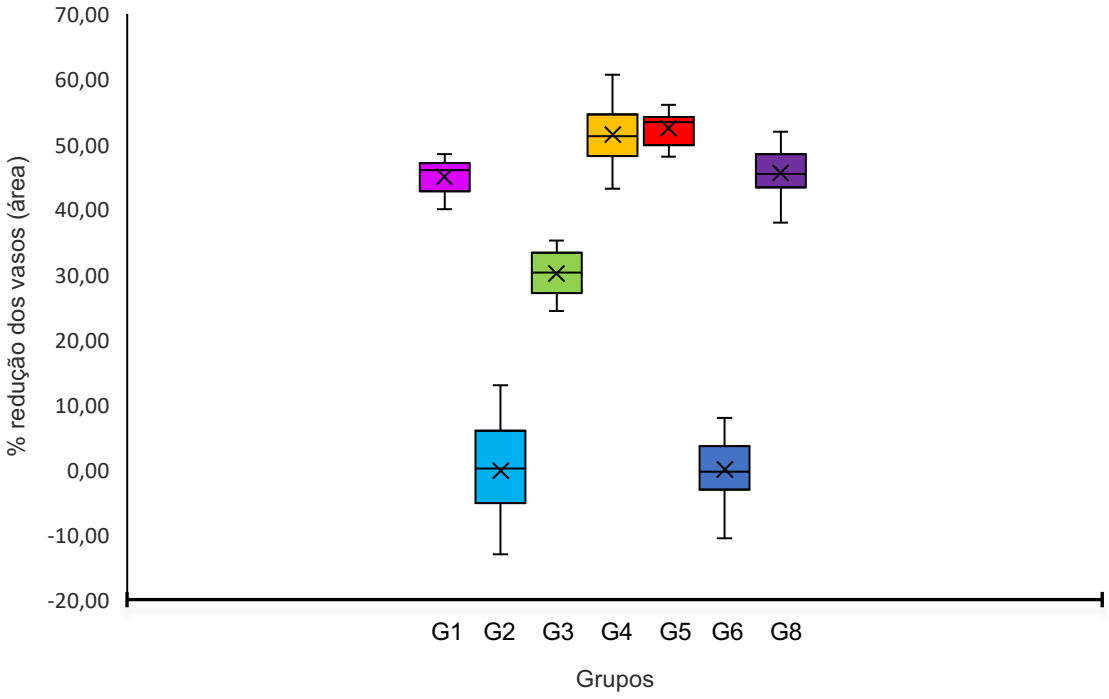
Figura 25 - Avaliação da atividade antiangiogênica – Imagens representativas dos grupos estudados

Além da observação visual qualitativa dos vasos, as imagens obtidas permitiram a quantificação da área total dos vasos.

Esta etapa do trabalho teve o objetivo de demonstrar o potencial antiangiogênico dos fármacos após incorporados nos implantes desenvolvidos. Os resultados obtidos (Figura 26A e 26B) sugerem que a vascularização da CAM foi reduzida nos ovos tratados com as formulações contendo os fármacos individualmente ou em associação (G1, G3, G4, G5 e G8). Foi observado nesses grupos a redução no número e calibre dos vasos da CAM. Apenas os grupos (G2, G6 e G7) que não possuíam fármacos não apresentaram redução no calibre dos vasos.



(A)



(B)

Figura 26 - (A) % de área dos vasos no ensaio na CAM, (B) % de redução na área dos vasos com desvios

G1: implante de dexametasona + nanofibra 2,7% bevacizumabe, G2: Placebo de implante revestido, G3: implante de dexametasona, G4: nanofibra 2,7% bevacizumabe, G5: solução bevacizumabe (controle positivo), G6: controle negativo, G8: implante de dexametasona + nanofibra 2,7% bevacizumabe + nanofibra PCL

Foi realizado teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) para cada um dos Grupos (G1 a G6 e G8) sendo que todos apresentaram-se como paramétricos, isto é, seguem a curva de Gauss, apresentando normalidade. Diante disso, foi aplicado teste t de *Student* para os pares de grupos com o objetivo de identificar os pares estatisticamente semelhantes e diferentes.

A comparação entre G2 (placebo) e G6 (controle negativo), ambos grupos isentos de fármacos, demonstrou que os grupos não apresentam diferença significativa entre os pares (*p-value* $>$ 0,05).

A comparação entre G1 e G3, demonstrou que o implante de dexametasona e o implante de dexametasona revestido com nanofibras contendo bevacizumabe apresentaram alterações estatisticamente diferentes na redução de vasos. Portanto, a associação dos fármacos apresenta relevância terapêutica visto que a redução dos neovasos foi maior na associação dos fármacos.

A comparação entre G1 e G8, demonstrou que ação antiangiogênica nesses dois grupos é semelhante, pois não apresentam diferença significativa (*p-value* $>$ 0,05). Sendo assim, a adição da segunda camada de revestimento com nanofibras de PCL não interferiu na ação antiangiogênica do fármaco.

É conhecido que a angiogênese no segmento posterior do olho é a principal causa de perda de visão e doenças importantes, como retinopatia diabética e degeneração macular relacionada à idade, estão relacionadas à neovascularização. Os vasos recém-crescidos podem levar à ruptura do epitélio pigmentar da retina e dos fotorreceptores, bem como causar hemorragia e descolamento da retina (Lau, et al., 2018). O VEGF desempenha um papel no controle da angiogênese e por esse motivo, fármacos anti-VEGF são amplamente utilizadas no controle dessas doenças. O bevacizumabe foi utilizado como controle positivo por ser um anticorpo monoclonal que se liga a todas as isoformas do VEGF e tem atividade antiangiogênica comprovada (Tan, et al., 2022; Kaiser, et al., 2021). Apesar da diferença significativa ($p<0,05$) do grupo controle (52,42%), implantes não revestidos contendo dexametasona e

implantes revestidos com nanofibras demonstraram, respectivamente, 30,14% e 45,49% de redução dos vasos (Figura 26B). A atividade antiangiogênica da dexametasona também já foi relatada anteriormente (Booth, et al., 2007) (Egoshi, et al., 2015) e pudemos mostrar em nosso estudo que sua associação com bevacizumabe aumentou o potencial da formulação na redução de vasos.

As informações da área dos vasos associada à micrografia em alta resolução demonstraram os efeitos antiangiogênicos do sistema desenvolvido. Além da informação de redução na formação de neovasos, as imagens não demostraram evidências ou sinais de toxicidade, tais como rompimento de vasos ou presença de hemorragias. E ainda considerando, especificamente que as imagens de G2 (placebo) e G6 (controle negativo) não demostraram sinais de toxicidade, sugere-se que a formulação é biocompatível.

As imagens dos embriões de galinha foram registradas no décimo dia de desenvolvimento embrionário (Figuras 27A e 27B) e demonstraram que os ovos submetidos aos tratamentos contendo bevacizumabe e dexametasona, em associação ou separadamente, apresentaram alteração na evolução do desenvolvimento embrionário (G1, G3, G4, G5, G8) quando comparados aos grupos sem os fármacos ativos (G2, G7, G6). Os fármacos aplicados topicamente à CAM podem atingir a circulação sistêmica, após absorção pela membrana e afetar o desenvolvimento do embrião de galinha (Vargas, et al., 2007). Diante disso, sugere-se que a alteração do desenvolvimento embrionário foi causada pela redução da formação dos vasos que permitiram um aporte de nutrientes de forma ineficiente ou reduzida.

As Figuras 27B e 27C apresentam embriões que receberam tratamento contendo bevacizumabe com e sem associação a dexametasona (G1, G4, G5, G8). Foi observada, visualmente, evidente diferença no desenvolvimento embrionário quando comparados aos grupos sem os fármacos ativos (G2, G6, G7). No entanto, não foi possível associar o grau de desenvolvimento embrionário à associação dos fármacos, pois visualmente não houve grandes diferenças no tamanho dos embriões dos grupos G1, G3, G4, G5 e G8.

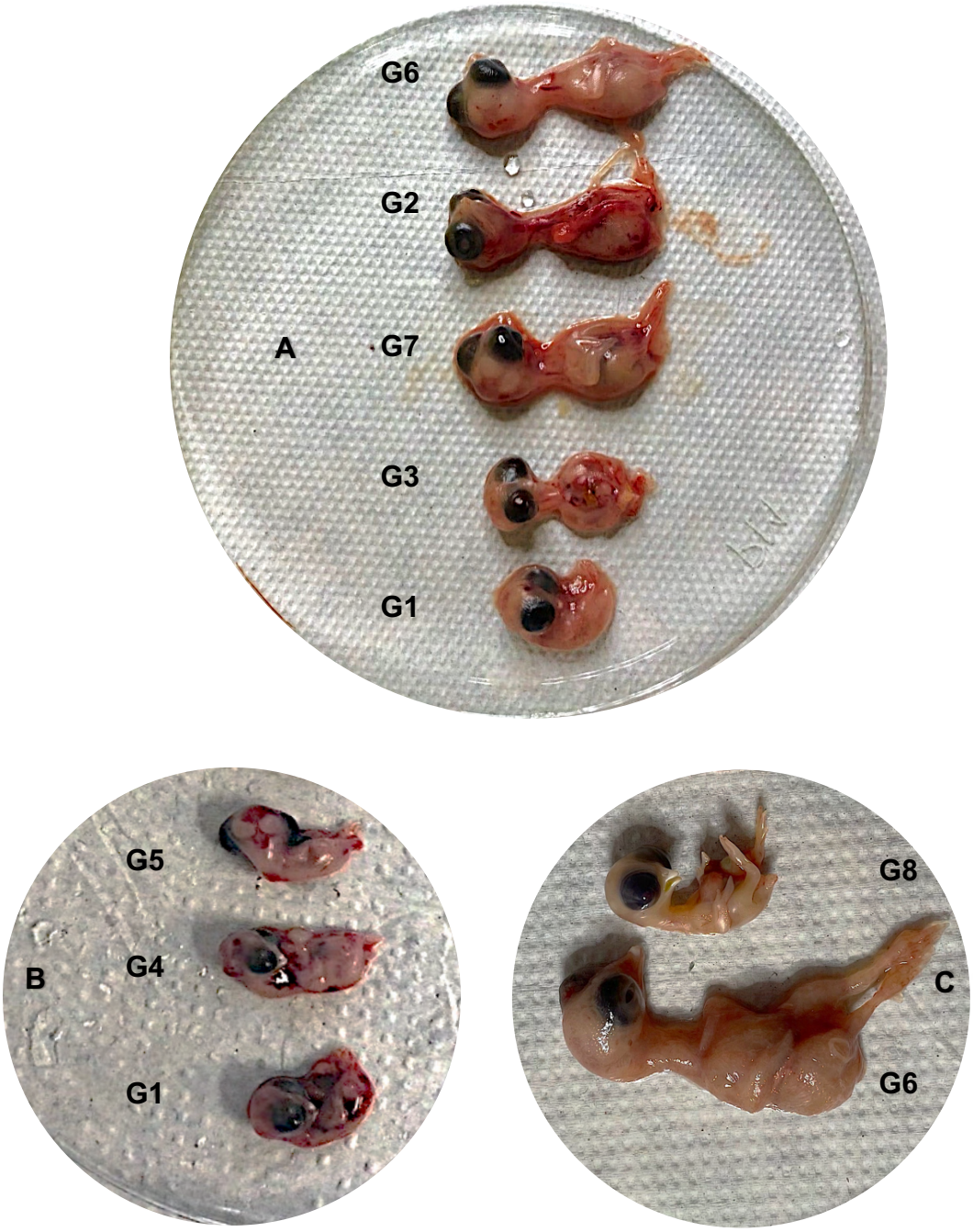


Figura 27 - Embriões com 10 dias, após ensaio na CAM.
G1: implante de dexametasona + nanofibra 2,7% bevacizumabe, G2: placebo de implante revestido, G3: implante de dexametasona, G4: nanofibra 2,7% bevacizumabe, G5: solução bevacizumabe (controle positivo), G6: controle negativo, G7: nanofibra sem fármaco, G8: implante de dexametasona + nanofibra 2,7% bevacizumabe + nanofibras PCL.

6 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS IMPLANTES BIODEGRADÁVEIS DE PLGA E DEXAMETASONA REVESTIDO POR NANOFIBRAS CONTENDO BEVACIZUMABE

A segurança dos implantes desenvolvidos foi avaliada através do exame de tomografia de coerência ótica (OCT) e avaliação clínica em coelhos conforme esquema abaixo (Figura 28). Os procedimentos experimentais com animais foram realizados em conformidade com as normas da resolução para uso de animais em pesquisa da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO). Os estudos de toxicidade foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Funed sob o protocolo 01/2022 e realizados no biotério experimental da Funed.

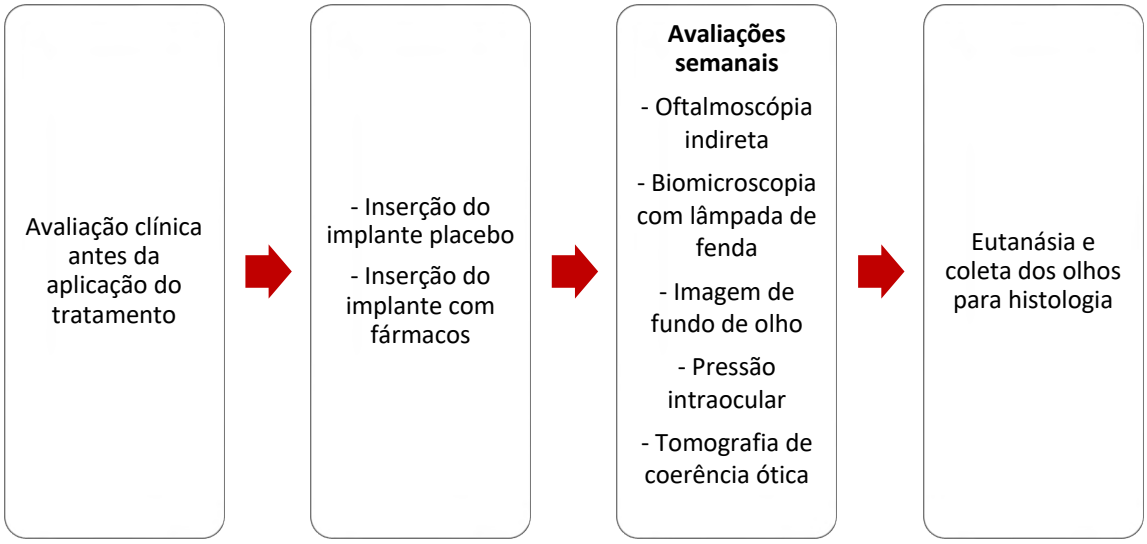


Figura 28 - Protocolo esquemático do ensaio *in vivo*

6.1 Materiais e Métodos

6.1.1 Materiais

Implante dexametasona revestido com nanofibras de PVA contendo bevacizumabe e nanofibras de PCL, Implante placebo: Implante de PLGA revestido com nanofibras de PVA (sem fármaco) e revestido com nanofibra de PCL, cloridrato de cetamina (Dopalen®, Ceva, Brasil) cloridrato de xilazina (Xilazin®, Syntec, Brasil) e cloridrato de proximetacaína (Anestalcon, Alcon, Brasil), cânula transescleral (Alcon, Forth Worth, Estados Unidos das Américas).

6.2 Inserção dos implantes na cavidade vítrea dos olhos dos coelhos

Foram utilizados 9 coelhos machos da raça Nova Zelândia, com idade entre 2 e 3 meses e peso inicial aproximado de 1,5 a 2,0 Kg, obtidos na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (Igarapé, MG, Brasil). Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação da FUNED, o qual é climatizado (16 a 22ºC), com trocas completas de ar sem filtração absoluta e com fotoperíodo respeitado. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período do experimento. A ração e água fornecidas *ad libitum* com monitoramento diário. Antes de iniciar o experimento, todos os animais foram examinados para verificação de ausência de previa alteração ocular.

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de cloridrato de cetamina 22mg/Kg e cloridrato de xilazina 3,0 mg/kg e instilação tópica de cloridrato proximetacaína.

Para a implantação do sistema, uma cânula transescleral (trocar) de 23 gauge de espessura foi utilizado. A cânula transescleral foi colocada através da *pars plana* do olho no quadrante subtemporal pela qual os implantes foram inseridos. (Figura 29). Os animais foram divididos em 3 grupos sendo que 3 animais receberam os implantes biodegradáveis placebo nos dois olhos, outros 3 animais receberam os implantes com os fármacos nos dois olhos e outros 3 animais serviram como controle do experimento não recebendo nenhum implante. Os olhos foram monitorados semanalmente por até 28 dias, conforme Figura 28.

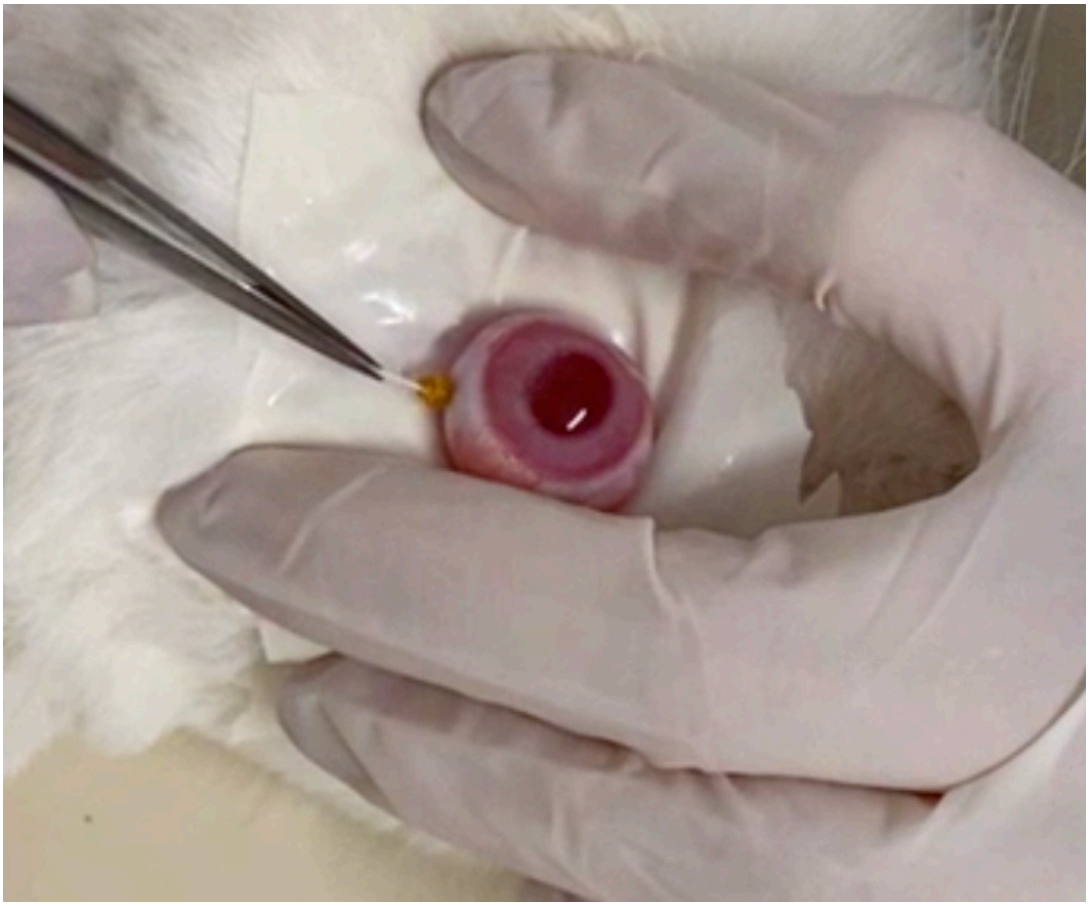


Figura 29 - Implantação na cavidade vítrea do coelho

6.2.1 Avalição clínica

A avaliação clínica foi realizada nos animais (n = 6) de cada grupo antes da inserção dos implantes e semanalmente até o 28º dia após.

Para realização da avaliação clínica, os animais tiveram seus olhos anestesiados com colírio de tropicamida. Foram realizados exames de pressão intraocular (PIO) com tonômetro (Tonopen XL, Reichert Technologies, Estados Unidos das Américas). Em seguida foi realizada inspeção ocular com biomicroscopia com lâmpada de fenda (Apramed®, São Paulo, Brasil) e oftalmoscopia indireta binocular (oftalmoscópio Eyetec OHD 4.2, Eyetec Equipamentos Oftalmológicos, São Carlos, Brasil) para avaliação dos segmentos anterior e posterior do olho, bem como a superfície ocular.

Quando presentes, sinais de inflamação, sangramento ou ocorrência de descolamento de retina, alterações nas pálpebras, conjuntiva bulbar e palpebral, córnea, câmara anterior, íris, cristalino, vítreo, retina, nervo óptico e coroide foram registrados.

6.2.2 Tomografia de coerência óptica (OCT)

A avaliação do fundo de olho e da espessura da retina de coelhos para acompanhamento após a administração intravítrea de implantes revestidos com nanofibras foi feita usando o equipamento OCT (Spectralis HRA+OCT, Heidelberg Engineering GmbH, Alemanha).

Antes do exame, os animais foram anestesiados (cloridrato de cetamina 22 mg/kg intramuscular e cloridrato de xilazina 3,0 mg/kg) e suas pupilas foram dilatadas com colírio de tropicamida 0,5% (p/v). As imagens foram capturadas usando uma lente de 55º e várias varreduras foram feitas de ambos os olhos.

A avaliação da morfologia e espessura da retina foram realizadas em todos os animais (n = 6) antes da implantação e semanalmente até o 28º dia após a implantação. A espessura total da retina foi medida a partir de imagens de OCT obtidas a aproximadamente 1 mm da cabeça do disco óptico usando o software Heyex Ophthalmic Image Management Platform (versão 6.13.3.0). Os animais de todos os grupos foram submetidos à mesma avaliação OCT.

6.2.3 Histologia

Análises histopatológicas foram realizadas nos animais dos grupos controle após 28 dias e nos animais do grupo implantes revestidos com nanofibras com fármacos após os tempos de 7, 14 e 28 dias. Os coelhos foram sacrificados e os olhos foram imediatamente enucleados. Em seguida, fixados em solução de Davidson (duas partes de formalina tamponada com fosfato neutro 10%, três partes de etanol 95%, uma parte de ácido acético glacial e três partes de água ultrapura) por 24 horas, desidratados com etanol e embebidos em parafina. Foram cortados em 5 µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina e examinados por microscopia de luz (Zeiss, modelo Axio Imager M2, Alemanha).

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Avaliação Clínica

Não houve alteração significativa na pressão intraocular dos animais ao longo do experimento (Figura 30). Além disso, não foram identificadas alterações significativas relacionadas a inflamação, hemorragia, descolamento de retina,

edema de retina nem hiperemia conjuntival, presença de células e *flare* na câmara anterior, catarata ou neblina vítrea (Figura 31). Apenas um animal do grupo controle e um do grupo que recebeu o placebo da formulação apresentaram hiperemia conjuntival bulbar discreta e irite em ambos os olhos após 21 dias do início, mas resolveram sem tratamento.

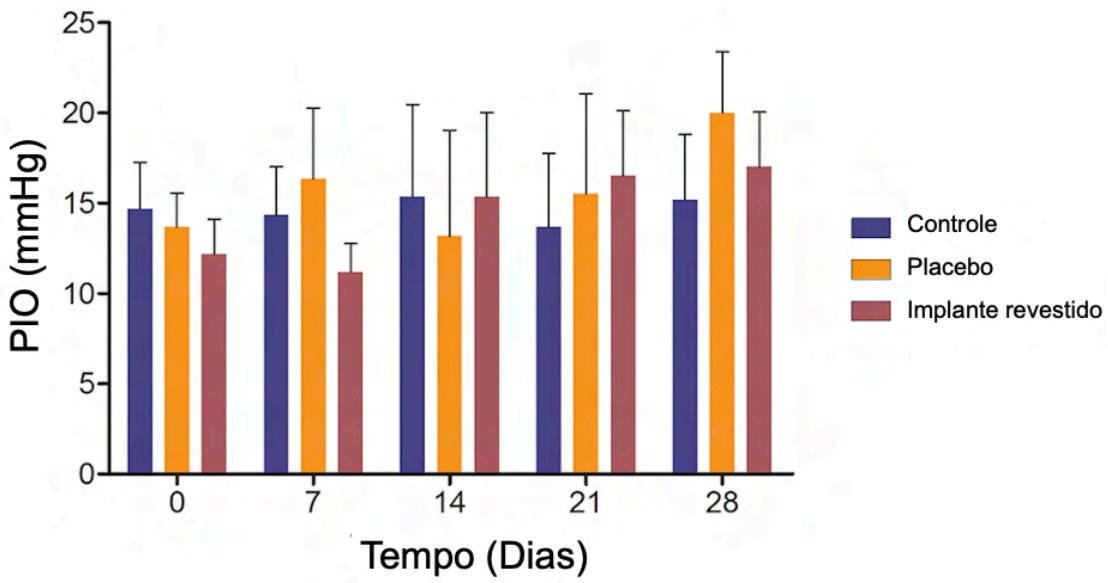


Figura 30 - Pressão intraocular dos grupos avaliados em diferentes intervalos de tempo (valores representados como média ± desvio padrão, n=6)

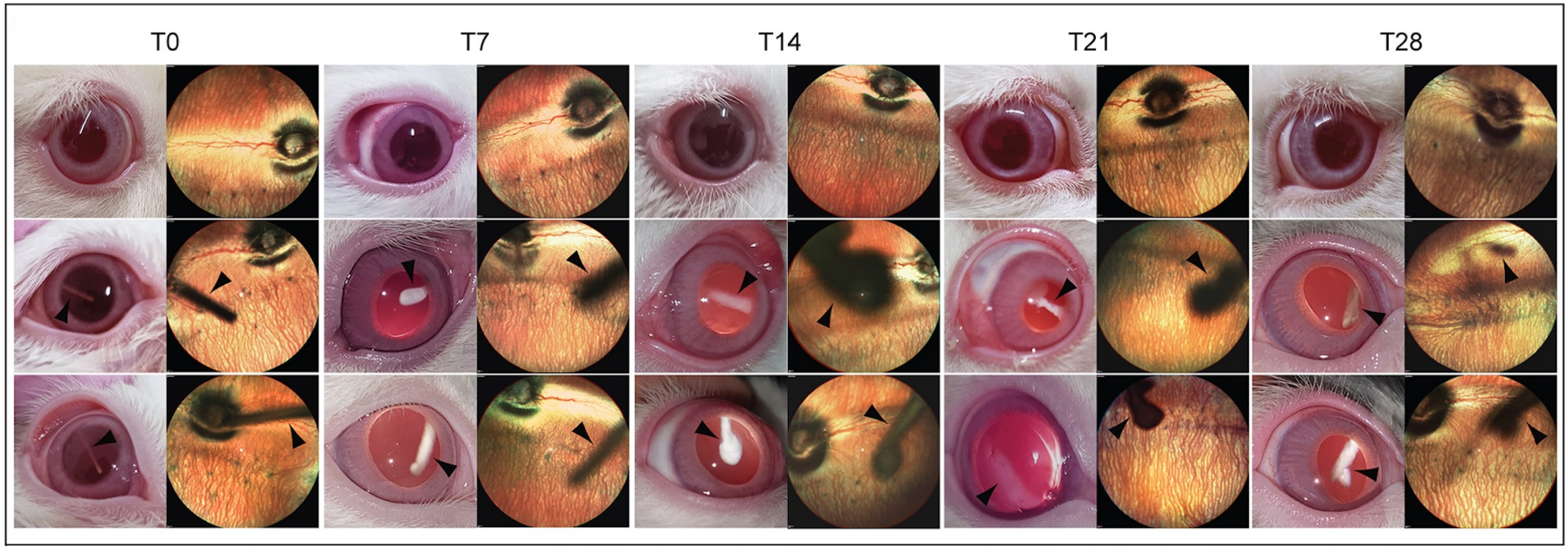


Figura 31 - Imagens representativas da visão macroscópica do olho e fundo do olho do grupo controle (acima); implante em branco (meio); implante com fármacos (abaixo). As setas mostram o implante dentro do vítreo. Grupo controle: sem tratamento; implante em branco: implante revestido com nanofibras sem fármaco; implante com fármacos: implante revestido de nanofibra contendo dexametasona e bevacizumabe.

6.3.2 Tomografia de coerência óptica (OCT)

OCT está sendo frequentemente usado como uma ferramenta eficaz para a compreensão de doenças da retina e da coroide. É uma técnica não invasiva que permite uma visualização tridimensional da retina, bem como da sua estrutura vascular com alta resolução e precisão, sendo capaz de identificar diferentes tipos de lesão oculares em distintas camadas do olho humano (Muraoka, et al., 2012). Nesse estudo, a OCT foi utilizada para avaliar a espessura e morfologia da retina antes e após a aplicação de implantes revestidos com nanofibras com o objetivo de avaliar sua biocompatibilidade após administração intravítrea em coelhos. A Figura 32 mostra imagens OCT representativas da retina de coelhos antes e semanalmente até 28 dias após a implantação.

Não foram observadas alterações aparentes na morfologia da retina dos animais dos três diferentes grupos avaliados: naïve (sem tratamento, controle), implantes revestidos com nanofibras com fármacos, implantes revestidos com nanofibras sem fármacos (implante em branco). Além disso, não houve diferença significativa na espessura da retina entre os grupos avaliados ($p<0,05$), sugerindo que os implantes revestidos com nanofibras são seguros para a retina (Figura 33).

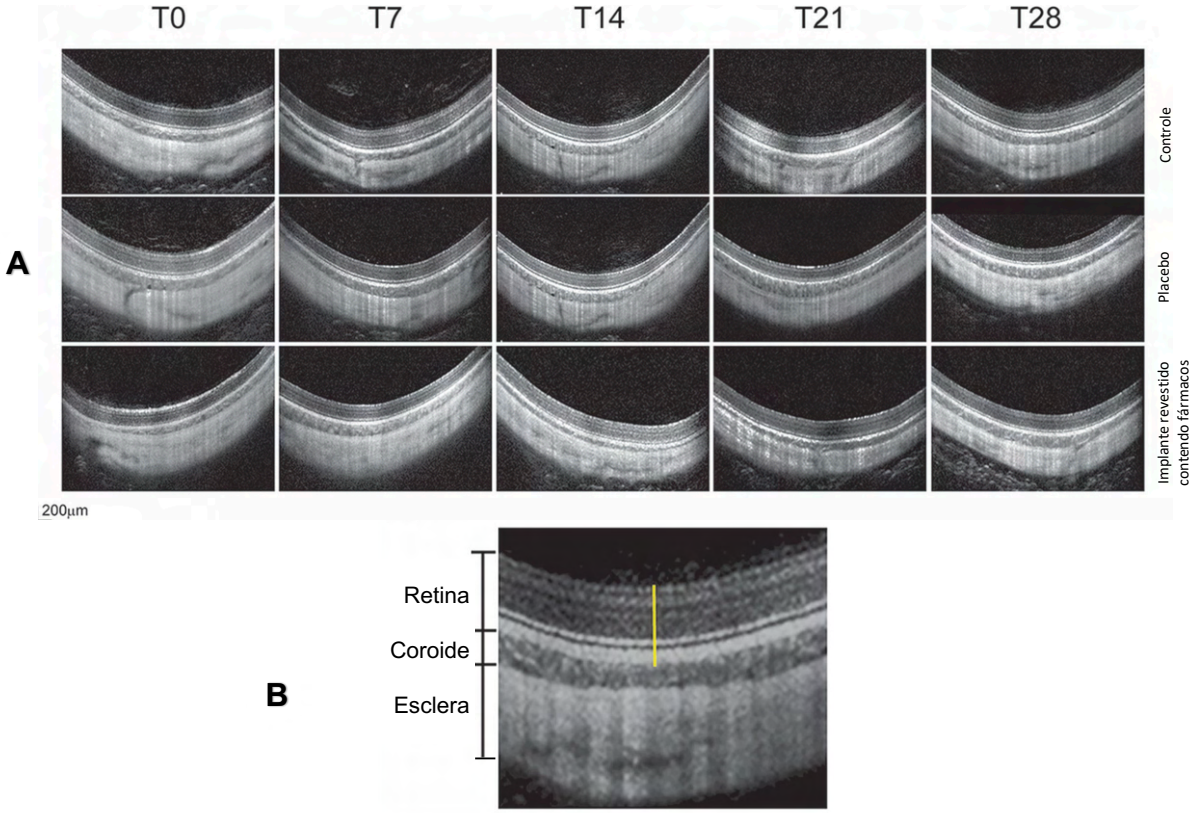


Figura 32 - A: Imagens representativas de OCT da retina de coelhos (linha superior: Grupo controle; intermediária: Placebo e linha inferior: Implante revestido); B: Imagem de OCT mostrando as camadas do segmento posterior do olho com identificação (amarelo) da medida da espessura da retina.

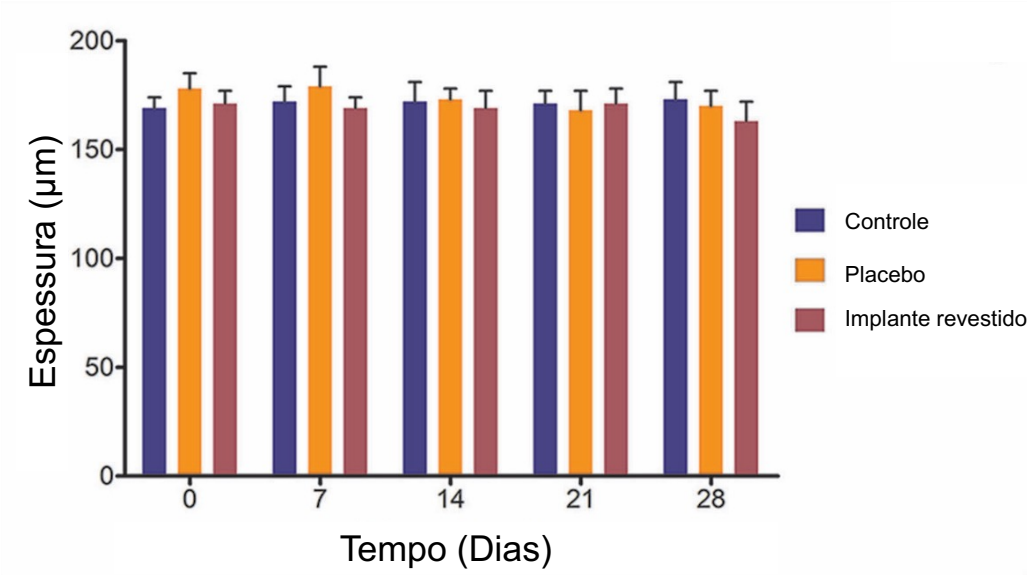


Figura 33 - Espessura retiniana dos grupos avaliados em diferentes intervalos de tempo (valores representados por média ± desvio padrão, n=6).

Grupo controle: sem tratamento; Placebo: implante revestido de nanofibra sem fármaco; Implante revestido: implante revestido de nanofibra contendo dexametasona e bevacizumabe.

6.3.3 Histologia

Fotomicrografias de cortes de retina de olhos de coelhos que receberam implantes revestidos com nanofibras com fármacos e grupo controle são apresentados na Figura 34. A morfologia da retina dos animais que receberam os implantes foi avaliada aos 7, 14 e 28 dias pós-implante e comparada com a retina do grupo controle.

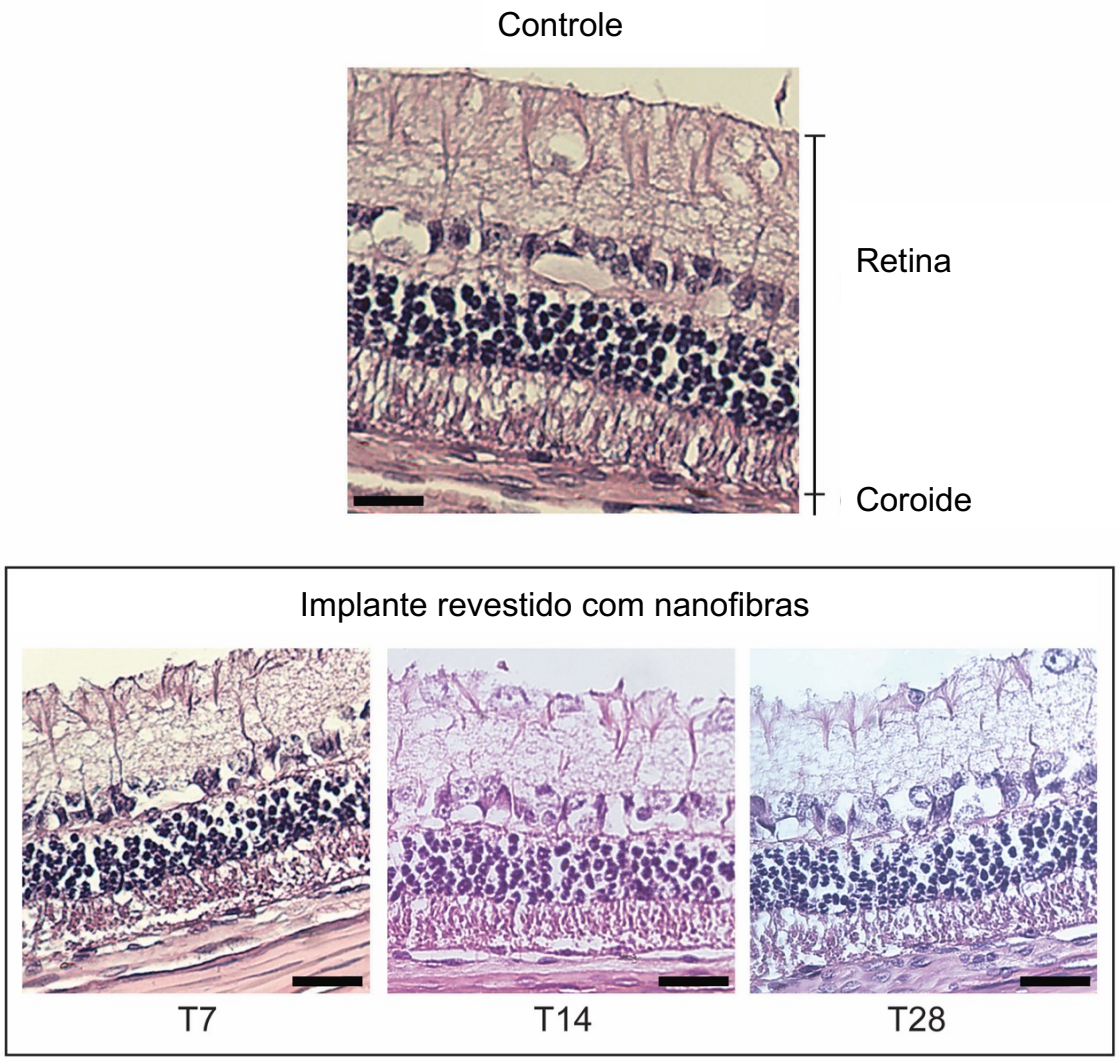


Figura 34 - Cortes histológicos representativos da retina de coelhos do grupo controle e após 7, 14 e 28 dias de administração do implante revestido com nanofibras. A anatomia normal da retina foi preservada durante os 28 dias de acompanhamento. Escala: 50µm

O exame histopatológico mostrou ausência de infiltrado de células inflamatórias, edema ou hemorragia. Além disso, a anatomia normal da retina foi preservada nos olhos que receberam os implantes, com células epiteliais pigmentares da retina e neurorretina fortemente conectadas e os fotorreceptores bem-organizados.

Assim, considerando que nenhuma alteração histológica foi encontrada em nenhuma camada da retina de coelhos que receberam o implante durante 28 dias de acompanhamento, e nenhuma diferença na morfologia microscópica da retina foi observada quando comparada ao grupo controle, podemos sugerir que o implante foi seguro para administração intravítrea.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de liberação prolongada, na forma de implantes biodegradáveis revestidos por nanofibras poliméricas com capacidade de carrear fármacos com características físico-químicas distintas e de forma associada.

A formulação contendo um fármaco antiangiogênico associado a um corticosteróide, a partir dos resultados dos testes de caracterização e atividade antiangiogênica, demostrou que tem potencial de reduzir a formação de vasos sanguíneos apresentando-se assim como uma promissora opção de tratamento para DMRI.

Os implantes revestidos com nanofibras mostraram-se seguros para a retina, uma vez que não foram observados, durante 28 dias de acompanhamento, nenhuma alteração clínica ou histopatológica, nem alteração na espessura da retina.

Esse sistema de entrega de implantes revestidos com nanofibras pode ser considerado uma nova e eficaz terapia para o tratamento da DMRI, doença que envolve a interação entre VEGF e células inflamatórias e, portanto, requer o uso de medicamentos que possam ser capazes de agir em ambas as situações simultaneamente em um tempo prolongado para reduzir a necessidade de injeções intravítreas frequentes.

Considerando que os implantes revestidos com nanofibras permitem a entrega de dois medicamentos ao mesmo tempo, eles podem ser capazes de reduzir os efeitos colaterais observados pelo uso de administrações intravítreas frequentes uma vez que a sua aplicação pode ocorrer em intervalo maiores quando comparado aos tratamentos, atualmente disponíveis, que envolvem a injeção intravítrea de fármacos e, portanto, podendo aumentar a adesão do paciente ao

tratamento. Além disso, permite ainda o uso de dose reduzida, diminuindo assim a possibilidade de eventos adversos relacionados ao fármaco.

8 PERSPECTIVAS

Futuros estudos que avaliem o perfil de liberação *in vivo* são importantes para melhor elucidação da biodistribuição do bevacizumabe liberado dos implantes desenvolvidos. Além isso, estudos que avaliem a eficácia do implante em modelo experimental da DMRI são de fundamental importância para prosseguir estudos clínicos.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA OBTIDA DURANTE O DOUTORADO

9.1 Artigos publicados

SOUZA, S.O.L.; **GUERRA, M.C.A.;** HENEINE, L.G.D.; OLIVEIRA, C.R.; SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S.L.; ORÉFICE, R.L. Biodegradable core-shell electrospun nanofibers containing bevacizumab to treat age-related macular degeneration. Journal of materials science. Materials in medicine (dordrecht. Online). v.29, p.1-11, 2018. doi:10.1007/s10856-018-6187-5.

DIAS, M.F.; FIGUEIREDO, B.C.P.; TEIXEIRA-NETO, J.; **GUERRA, M.C.A.;** FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. In vivo evaluation of antitumoral and antiangiogenic effect of imiquimod-loaded polymeric nanoparticles. Biomedicine & pharmacotherapy. v.103, p.1107-1114, 2018. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.079.

PAIVA, M. R. B.; LAGE, N. A.; **GUERRA, M.C.A.;** MOL, MA. P.G.; RIBEIRO, M. C.S.; FULGÊNCIO, G.O.; GOMES, D.A.; CÉSAR, I.C. FIALHO, S.L.; SILVA-CUNHA, A. Toxicity and in vivo release profile of sirolimus from implants into the vitreous of rabbits' eyes. Documenta ophtalmologica, v.138, p. 3-19, 2019. doi: 10.1007/s10633-018-9664-8.

CASTRO, B., **GUERRA, M.C.A.;** VIEIRA, L., VASCONCELOS-SANTOS, D., CENACH, S.P.F., COTTA, O., PAIVA, M.R B., SILVA, L.M., SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S.L.; Intravitreal thalidomide ameliorates inflammation in a model of experimental uveitis induced by BCG. International Immunopharmacology. v.81, p. abril 2020. doi:10.1016/j.intimp.2019.106129.

GUERRA, M.C.A.; TEIXEIRA-NETO J., GOMES, M.G.; DOURADO. L.F.N.; HENEINE, L.G.D.; ORÉFICE, R.L. SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S.L.; Nanofiber-coated implants: development and safety after intravitreal application in rabbits. International Journal of Pharmaceutics. 2023. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122809.

9.2 Patente depositada

GUERRA, M. C. A.; FIALHO, S. L.; MIRANDA, C.; CAMPOS, J. A.G.; SILVA-CUNHA, A. Implante biodegradável revestido por nanofibras poliméricas para administração intraocular de fármacos, Processo e uso, 2020. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020200005618. Data de depósito: 10/01/2020. Depositante/Titular: Fundação Ezequiel Dias, Universidade Federal de Minas Gerais.

9.3 Trabalhos apresentados em eventos científicos

GUERRA, M. C. A.; SOUZA, S. O. L.; MIRANDA, C.; OREFICE, R. L.; SILVA-CUNHA, A. FIALHO, S. L. Intraocular implant with dexamethasone coated with nanofiber containing bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration (AMD). In: 22nd International Symposium on Microencapsulation, 2019.

GUERRA, M. C. A.; SOUZA, S. O. L.; MIRANDA, C.; ARAUJO, L. A.; SILVA, A. C. B. B.; OREFICE, R. L.; SILVA-CUNHA, A. FIALHO, S. L. Nanofiber-coated intravitreal device for age-related macular degeneration treatment. In: II International conference on nanoscience and nanobiotechnology (Iconnano), 2021.

GUERRA, M. C. A.; MIRANDA, C.; SILVA, A. C. B. B.; OREFICE, R. L.; SILVA-CUNHA, A. FIALHO, S. L. Nanofiber-coated intravitreal device for age-related macular degeneration treatment. In: 13th International Congress of Pharmaceutical Sciences (13th Cifarp), 2021. (poster e apresentação oral).

GUERRA, M. C. A.; MIRANDA, C.; SILVA, A. C. B. B.; OREFICE, R. L.; SILVA-CUNHA, A. FIALHO, S. L. Nanofiber-coated intravitreal device for age-related macular degeneration treatment. In: Nano Research Day by CRS Brazilian Chapter, 2021. (apresentação oral).

GUERRA, M. C. A.; MIRANDA, C.; Santos, T. C. M.; OREFICE, R. L.; SILVA-CUNHA, A. FIALHO, S. L. Nanofiber-coated intravitreal device for age-related macular degeneration treatment. In: 6th ABCF Congress, 2022.

9.4 Premiação em eventos científicos

Prêmio de melhor trabalho na categoria Câncer e Saúde com o trabalho “Nanofiber-coated intravitreal device for age-related macular degeneration treatment” organizado pelo II International conference on nanoscience and nanobiotechnology (Iconnano), 2021.

Prêmio de segundo lugar, com a apresentação oral do trabalho “Nanofiber-coated intravitreal device for age-related macular degeneration treatment” no Nano Research Day organizado pela Controlled Release Society Brazilian Chapter no pré-congresso do 13º Cifarp, 2022.

Melhor vídeo no Trainee Video & Image Contests. Categoria: Video contest: “Nanofiber-coated intravitreal device for age-related macular degeneration treatment” organizado pelo Controlled Release Society - Ocular Delivery Focus Group. 2022. Disponível em: https://youtu.be/JM-NPE8FAOc.

10 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abrishami, M., et al. 2019. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (Avastin) for intravitreal administration. *Retina.* v. 29, n.5, p.699-703. doi:10.1097/IAE.0b013e3181a2f42a.

Adrianto, Muhammad Faris, et al. 2021. In vitro dissolution testing models of ocular implants for posterior segment drug delivery. *Drug Delivery and Translational Research.* doi:10.1007/s13346-021-01043-z.

Agrahari, Vibhuti, et al. 2017. How are we improving the delivery to back of the eye? Advances and challenges of novel therapeutic approaches. *Expert opinion on drug delivery.* v.14, n.10, p.1145-1162. doi:10.1080/17425247.2017.1272569.

Apte, Rajendra S. 2021. Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med.* doi:10.1056/NEJMcp2102061.

Arcinue, Cheryl A., Cerón, Olga M. e Foster, C. Stephen. 2012. A Comparison Between the Fluocinolone Acetonide (Retisert) and Dexamethasone (Ozurdex) Intravitreal Implants in Uveitis. *Journal of coular Pharmacology and therapeutics.* v.29, n.5, p.501-507. doi:10.1089/jop.2012.0180.

Aulestia-Vieira, P. V., et al. 2019. Oxytetracycline-loaded polymeric nanofibers for the treatment of dry socket: an in vivo evaluation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* v.48. doi:10.1016/j.ijom.2019.03.645.

AVMA - American Veterinary Medical Association. 2020. *Guidelines on Euthanasia.* 2020.

Awwad, S., et al. 2017. Principles of pharmacology in the eye. *British Journal of Pharmacology.* v.174, n.23. doi:10.1111/bph.14024.

Azabaryjani, Anahita Fathi e Chan, Sui Yung. 2010. Single and Multi-Layered Nanofibers for Rapid and Controlled Drug Delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* v.58, n.2, p.143-146. doi: 10.1248/cpb.58.143.

Bhardwa, N. e Kundu, S. C. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances.* v.28, p.235-347. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.

Biswas, N. R., Das, G. K. e Dubey, A. K. 2010. Monoclonal antibodies in ophthalmology. *Nepal Med Coll J.* v.12, p.264-271.

Bloch, S. B., Larsen, M. e Munch, I. C. 2012. Incidence of legal blindness from age-related macular degeneration in denmark: year 2000 to 2010. *Am J Ophthalmol.* v.153, n.2, p.209–213. doi:10.1016/j.ajo.2011.10.016.

Booth, B. A., et al. 2007. Sustained-release ophthalmic drug delivery systems for treatment of macular disorders. *Drugs Aging.* v.24, n.7, p.581-602. doi:10.2165/00002512-200724070-00006.

Brasil. Ministério da Saúde. 2018. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Degeneração Macular Relacionada à Idade (Forma Neovascular).Portaria Conjunta nº 18, de 02 de julho 2018. 02 de Jul de 2018.

Brasil. Ministério da Saúde. 2022. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Degeneração Macular Relacionada à Idade (Forma Neovascular).Portaria Conjunta nº 4, de 4 de março 2022.

Burton M. J., et al. 2021. The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: vision beyond 2020. *Lancet Glob Health.* v.9, n.4, p.489-551. doi:10.1016/S2214-109X(20)30489-7.

Cabral, T., et al. 2017. Retinal and choroidal angiogenesis: a review of new targets. *International Journal of Retinal and Vitreous.* v.3. doi:10.1186/s40942-017-0084-9.

Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. 2020. *Pharmacoeconomic Report: Brolucizumab (Beovu): (Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.).* Indication: Treatment of neovascular (wet) age-related macular degeneration (AMD).

Chaves, D.A., et al. 2016. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão. *Rev. Bras. Pl. Med.* v.18, n.2, p.524-530. doi:10.1590/1983-084X/15_093.

Chew, Y. W., et al. 2006. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Current pharmaceutical desing.* v.12, n.36, p.4751-4770. doi:10.2174/138161206779026326.

Chicagoca, V., et al. 2018. Cellular regeneration strategies for macular degeneration: past, present and future. *Eye(Lond).* v.32, p.946-971. doi:10.1038/s41433-018-0061-z.

Chronalis, I. S. 2005. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process - A review. *Journal of Materials Processing Technology.* v.167, p.283-293. doi:10.1016/j.jmatprotec.2005.06.053.

Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal/CFMV. 2013. *Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados.* Conselho Federal de Medicina Veterinária. Brasília.

Cunha, R. B., et al. 2016. Safety and feasibility of a novel 25-gauge biodegradable implant of dexamethasone for treatment of macular edema associated with retinal vein occlusion: a phase I clinical trial. *Retinal cases & Brief reports.* v.12, n.1. doi:10.1097/ICB.0000000000000413.

Das, Arup e McGuire, Paul G. 2003. Retinal and choroidal angiogenesis:pathophysiology and strategies for inhibition. *Progress in Retinal and Eye Research.* v.22, n.6, p.721-748. doi:10.1016/j.preteyeres.2003.08.001.

De Souza, Sarah O. L., et al. 2018. Biodegradable core-shell electrospun nanofibers containing bevacizumab to treat age-related macular degeneration. *Journal of Materials in Medicine.* v.173, n.29. doi:10.1007/s10856-018-6187-5.

Diaz, E., Sandonis, I. e VLLE, M. B. 2014. In Vitro Degradation of Poly(caprolactone)/nHA Composites. *Journal of Nanomaterials.* v.2014. doi:10.1155/2014/802435.

Edelhauser, H. F., et al. 2010. Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: basic research to clinical applications. *Investigative ophthalmology & visual Science.* v.51, n.11, p.5403-5420. doi:10.1167/iovs.10-5392.

Egoshi, Caroline Tiemi, et al. 2015. Quatificação da Angiogênese Induzida por tumor em Membrana corioalantóica de embrião de galinha. *Biosci. J.* v.31, n.1, p.303-310. doi:10.14393/BJ-v31n1a2015-23449.

Eichhorn, S.J., Sampson, W. W. 2005. Statistical Geometry of Pores and Statistics of Porous Nanofibrous Assemblies. *Journal of the Royal Society Interface.* v.2, p.309-318. doi:10.1098/rsif.2005.0039.

Eljarrat-Binstock, E., Peer, J. e Domb, A. J. 2010. New Techniques for Drug Delivery to the Posterior Eye Segment. *Pharmaceutical Research.* v.27, p.530-543. doi:10.1007/s11095-009-0042-9.

Fernandes-Cunha, Gabriella M., et al. 2017. Ocular safety of Intravitreal Clindamycin Hydrochloride Released by PLGA Implants. *Pharm Res.* v.34, n.5. doi:10.1007/s11095-017-2118-2.

Ferreira, A. E. R., et al. 2017. Antiangiogenic activity of a bevacizumab-loaded polyurethane device in animal neovascularization models. *Journal Français d'Ophtalmologie.* v.40, p. 202-208. doi:10.1016/j.jfo.2016.10.010.

Fialho, S. L., et al. 2007. Biodegradable implants for ocular delivery of anti-inflammatory drug. *Journal of drug delivery science and technology.* v.17, p.93-97. Doi: 10.1016/S1773-2247(07)50013-4.

Fialho, S. L., et al. 2003. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arq. Bras. Oftalmol.* v.66, n.6, p.891-896. doi:10.1590/S0004-27492003000700029.

Fialho, S. L., et al. 2006. Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. *Current eye research.* v.31, n.6, p.525-534. doi:10.1080/02713680600719036.

Fialho, S. L., Siqueira, R. C. e Silva-Cunha, A. 2005. Manufacturing Tecniques of Biodegradables Implants Intended for intraocular application. *Drug Delivery.* v.12, p.109-116. doi:10.1080/10717540590921432.

Fialho, Silvia Ligorio. 2006. *Desenvolvimento de implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular de corticóides.* Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte . p. 151, Tese (Doutorado).

Fialho, Silvia Ligorio, et al. 2013. In vivo release and retinal safety of intravitreal implants of thalidomide in rabbit eyes and antiangiogenic effect on the chorioallantoic membrane. *Journal of Drug Targeting.* v. 21, p.837-845. doi:10.3109/1061186X.2013.829074.

Fleckenstein, M., Keenan, T.D.L., Guymer, R.H. et al. 2021. Age-related macular degeneration. *Nature Reviews Disease Primers.* v.7, n.31. doi:10.1038/s41572-021-00265-2.

Garg, K. e Bowlin, Gary L. 2011. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluids.* v.5, n.1. doi:10.1063/1.3567097.

Gonçalves, R. P., et al. 2015. Morphology and Thermal Properties of Core-Shell PVA/PLA Ultrafine Fibers Produced by Coaxial Electrospinning. *Materials Sciences and Applications.* v.6, n.2, p.189-199. doi:10.4236/msa.2015.62022.

Greiner, Andreas e Wendorff, Joachin H. 2007. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International.* v.46, p.5670-5703. doi:10.1002/anie.200604646.

Griffioen, A. W. e Molema, G. 2000. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews.* v.52, n.2, p.237-268.

Hanout, M., et al. 2013. Therapies for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Current Approaches and Pharmacologic Agents in Development. *BioMed Research International.* v.2013. doi:10.1155/2013/830837.

Homaeigohar, S., et al. 2017. The Electrospun Ceramic Hollow Nanofibers. *Nanomaterials.* v.7, n.11. doi:10.3390/nano7110383.

Hu, C. C., et al. 2014. Controlled release bevacizumab in thermoresponsive hydrogel found to inhibit angiogenesis. *Biomedical Materials Enginnering.* v.24, p.1941-1950. doi:10.3233/BME-141003.

Huang, Z. M., et al. 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology.* v.63, p.2223-2253. doi:10.1016/s0266-3538(03)00178-7.

Iyer, Shwetha, et al. 2019. Long-acting intraocular Delivery strategies for biological therapy of age-related macular degeneration. *Journal of Controlled Release.* v.296, p.140-149. doi:10.1016/j.jconrel.2019.01.007.

Jaffe, G. J., et al. 2006. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis - Thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study. *Ophthalmology.* v.113, n.6, p.1020-1027. doi:10.1016/j.ophtha.2006.02.021.

Kaiser, S.M., Arepalli, S. e Ehlers, J.P. 2021. Current and Future Anti-VEGF Agents for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Experimental Pharmacology.* v.13, p.905-912. doi:10.2147/JEP.S259298.

Kane, F. E., et al. 2008. Iluvien: a new sustained delivery technology for posterior eye disease. *Expert Opinion on Drug Delivery.* v.5, n.9, p.1039-1046. doi:10.1517/17425247.5.9.1039.

Kang-Mieller, J. J., Osswald, C. e Mieller, W. F. 2014. Advances in ocular drug delivery: Emphasis on the posterior segment. *Expert Opinion on Drug Delivery.* v.11, n.10. doi:10.1517/17425247.2014.935338.

Kaur, I. P. e Kakkar, S. 2014. Nanotherapy for posterior eye diseases. *Journal of Controlled Release.* v.193, p.100-112. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.031.

Kuppermann, B. D., et al. 2007. Randomized Controlled Study of an Intravitreous Dexamethasone Drug Delivery System in Patients With Persistent Macular Edema. *Archives of Ophthalmology.* v.125, n.3, p.309-317. doi:10.1001/archopht.125.3.309.

Lajavardi, L., et al. 2007. Downregulation of endotoxininduced uveitis by intravitreal injection of vasoactive intestinal Peptide encapsulated in liposomes. *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences.* v.48, n.7, p.3230-3238. doi:10.1167/iovs.06-1305.

Lau, C. M. L., et al. 2018. Controlled release technology for anti-angiogenesis treatment of posterior eye diseases: Current status and challenges. *Advanced drug delivery reviews.* v.126, p.145–161. doi:10.1016/j.addr.2018.03.013.

Lim, L. S., et al. 2012. Age-related macular degeneration. *Lancet.* v.379, p.1728-1738. doi:10.1016/S0140-6736(12)60282-7.

Mattoso, Luiz H. C., et al. 2012. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* v.22, n.2, p.170-177. doi:10.1590/S0104-14282012005000026.

Mitchell, P., et al. 2018. Age-related macular degeneration. *Lancet.* v.392, n.10153, p.1147-1159. doi:10.1016/S0140-6736(18)31550-2.

Muraoka, Y., et al. 2012. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One.* 7, 4. doi:10.1371/journal.pone.0036135.

Nair, L. S. e Laurencin, C. T. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science.* v.32, n.8, p.762-798. doi:0.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.

National Eye Institute. 2021. Age-related Macular Degeneration. [Online] [Citado em: 8 de mar de 2023.] https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/eye-conditions-and-diseases/age-related-macular-degeneration.

Nayak, K. e Misra, M. 2018. A review on recent drug delivery systems for posterior segment of eye. *biomedicine & Pharamcotherapy.* v.107, p.1564-1582. doi:10.1016/j.biopha.2018.08.138.

Neumann, R. e Barequet, D. 2019. The gap between the need for novel retinal drug delivery methods, technologies in R&D phase, and approved ocular drug

delivery technologies. *Drug Discovery Today.* v.24, n.8, p.1433-1435. doi:10.1016/j.drudis.2019.03.018.

Nista, Silvia Vaz Guerra, et al. 2013. Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning. Part II. Controlled release profile and microbiological behavior. *Journal of Applied Polymer Science.* v.130, n.4. doi:10.1002/a39362.

Nowak, Jerzy Z. 2006. Age-relate macular degeneration: pathogenesis and therapy. *Pharmacological Reports.* v.58, p.353-363.

Nowak-Sliwinska, P., et al. 2010. Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by antiangiogenic agents in the CAM model. *Microvasc Res.* v.79, n.1, p.21-28. doi:10.1016/j.mvr.2009.10.004.

Okabe, J., et al. 2003. Biodegradable intrascleral implant for sustained intraocular delivery of betamethasone phosphate. *Investigative ophthalmology and visual science.* v.44, p.740-744. doi:10.1167/iovs.02-0375.

Peyman, G. A. e Ganiban, G. J. 1995. Delivery systems for intraocular routes. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v.16, n.1, p.107-123. doi:10.1016/0169-409X(95)00018-3.

Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W. E., Lim T. C., Ma Z. 2005. Electrospinnig Process. *An Introduction To Electrospinning And Nanofibers.* s.l. : World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2005. doi:10.1142/9789812567611_0003.

Rauck, B. M., et al. 2014. Biocompatible reverse thermal gel sustains the release of intravitreal bevacizumab in vivo. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* v.55, p.469-476. doi:10.1167/iovs.13-13120.

Ribatti, D., Vacca, A. e Dammacco, F. 2000. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on antiangiogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* v.1, n.1, p.73-82. doi:10.2174/1389201003379040.

Rivelli, G. G., et al. 2021. Biodegradable Electrospun Nanofibers: A New Approach For Rhinosinusitis Treatment. *European Journal of Pharmaceutical Science.* v.163. doi:10.1016/j.ejps.2021.105852.

Rothen-Weinhold, A., et al. 1999. Injection-molding versus extrusion as manufacturing technique for the preparation of biodegradable implants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* p.133-121. doi:10.1016/s0939-6411(99)00034-x.

Schmidt-Erfurth, U., et al. 2014. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *British Journal of Ophthalmology.* v.98, n.9, p.1144-1167. doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305702.

Shahla, Mirzaeei, et al. 2021. Polyvinyl Alcohol/Chitosan Single-Layered and Polyvinyl Alcohol/Chitosan/ Eudragit RL100 Multi-layered Electrospun Nanofibers as an Ocular Matrix for the Controlled Release of Ofloxacin: an In Vitro and In Vivo Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* v.22, n.5. doi:10.1208/s12249-021-02051-5.

Sherif, Z. e Pleyer, U. 2002. Corticosteroids in ophthalmology: past-present-future. *Ophthalmology.* v.133, n.6, p.845-847. doi:10.1159/000066189.

Shima, D.T., et al. 1995. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Molecular Medicine.* v.1, n.2, p.182-193.

Silva, G. R., et al. 2010. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* v.46, n.3. doi:10.1590/S1984-82502010000300024.

Silva-Cunha, A., Siquera, R. C. e Fialho, S. L. 2006. *Biodegradable device for intraocular drug delivery. BRPI0604577A* [trad.] DISPOSITIVO BIODEGRADÁVEL PARA ADMINISTRAÇÃO INTRA-OCULAR DE FÁRMACOS. Brasil, 04 de Ago de 2006. Categoria: Produto e Processo.

Silva-Cunha, A., Vlillanova, J. C. O. e Orefice, R. L. 2010. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* v.20, p.51-64. doi:10.1590/S0104-14282010005000009.

Singer, Michael A., et al. 2012. Effect of combination therapy with bevacizumab and dexamethasone intravitreal implant in patients with retinal vein occlusion. *Retina, The Journal of retinal and vitreous diseases.* v.32, n.7, p.1289-1294. doi:10.1097/IAE.0b013e318242b838.

Singh, H., et al. 2015. Transmucosal delivery of Docetaxel by mucoadhesive polymeric nanofibers. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.* v.43, n.4, p.263-269. doi:10.3109/21691401.2014.885442.

Song, J. H., Kim, H. E. e Kim, H. W. 2008. Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine volume.* v.19, p. 95-102. doi:10.1007/s10856-007-3169-4.

Song, R., et al. 2018. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy.* v.12, p.3117-3145. doi:10.2147/DDDT.S165440.

Sousa, F., et al. 2017. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Nature.* v.7. doi:10.1038/s41598-017-03959-4.

Tan, C.S., et al. 2022. Neovascular Age-Related Macular Degeneration (nAMD): A Review of Emerging Treatment Options. *Clinical ophthalmology.* v.16, p.917-933. doi:10.2147/OPTH.S231913.

Todorich, B., et al. 2017. Simultaneous dexamethasone intravitreal implant and anti-VEGF therapy for neovascular age-related macular degeneration resistant to anti-VEGF monotherapy. *Journal Vitreoretinal Diseases.* 2017, v.1, p.65-74. doi:10.1177/2474126416683299.

Tsai, C. H., et al. 2018. Ocular Drug Delivery: Role of Degradable Polymeric Nanocarriers for Ophthalmic Application. *International Journal of Molecular Sciences.* v.19. doi:10.3390/ijms19092830.

Vakalis, N., et al. 2015. Intravitreal Combination of Dexamethasone Sodium Phosphate and Bevacizumab in The Treatment of Exudative AMD. *Nature.* v.5. doi:10.1038/srep08627.

Vargas, A., et al. 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v.59, p.1162-1176. doi:10.1016/j.addr.2007.04.019.

Venturellil, R. B. e Gripa, S. 2017. Eletrofiação: uma alternativa para a produção de não tecidos. *Revista da UNIFEBE.* set./dez. de 2017, v.1.

Villegas V. M., Aranguren L. A., Kovach J. L., Schwartz S. G., Flynn H. W. Jr. 2016. Current advances in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opinion on Drug Delivery.* v.14, n.2, p.273-282. doi:10.1080/17425247.2016.1213240.

Wang, T., Turhan, M. e Gunasekaran, S. 2004. Selected propeties of Ph-sensitive, biodegrable chitosan-poli(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International.* v.53, n.7, p. 911-918. doi:10.1002/pi.1461.

Witmer, N. A., et al. 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in retinal and eye research.*v.27, n.4, p.331-371. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.05.001.

Witt, C., Mader, K. e Kissell, T. 2000. The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression moulding of poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers. *Biomaterials.* v.21, n.9, p.931-938. doi:10.1016/S0142-9612(99)00262-8.

Wong, Chee Wai. e Wong, Tina. T. 2019. Posterior segment drug delivery for the treatment of exudative age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *BR J Ophthalmol.* v.103, n.10, p.1356-1360. doi:10.1136/ bjophthalmol-2018-313462.

Wong, Wan Liang, et al. 2014. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* v.2, n.2, p.106–116. doi:10.1016/S2214-109X(13)70145-1.

World Health Organization. 2022. Blindness and vision impairment. *World Health Organization.* [Online]. [Citado em: 27 de fev. de 2023.] https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment.

World Health Organization. 2019. World Report on Vision. [Online]. https://www.who.int/publications/i/item/world-report-on-vision.

Yandrapu, S.K., et al. 2013. Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab. *Molecular Pharmacology.* v.10, p. 4676-4686. doi:10.1021/mp400487f.

Yu, D. G., et al. 2009. Ultrafine ibuprofen-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats using electrospinning. *Polymer International.* v.58, n.9, p.1010-1013. doi:10.1002/pi.2629.

11 ANEXOS

Anexo 1:Certificado de aprovação do projeto para tetes in vivo pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Ezequiel dias

FUNED
Fundação
Ezequiel Dias

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação do potencial terapêutico e toxicidade em modelo animal de um novo dispositivo de liberação intraocular para tratamento de degeneração macular relacionada à idade",** registrado com o nº **001/2022**, sob a responsabilidade de **Sílvia Ligório Fialho**- que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Portanto, o projeto foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Fundação Ezequiel Dias, em 25/02/2022.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	25/02/2022 a 25/02/2024
Espécie/linhagem/raça	Coelhos Nova Zelândia
Nº de animais	49
Peso/Idade	-
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	DSI-Comércio, Importação e Exportação LTDA. Chácara Flor do Vale, Esmeraldas, MG

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste parecer e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-FUNED o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e nas publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008 e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, ou seja, até **25/03/2024**.

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2022.

[redacted]

Clara Guerra Duarte
Coordenadora da CEUA/FUNED

Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, MG.
CEP 30510-010 Telefone: (31) 3314-4645