# **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

## FACULDADE DE MEDICINA

## DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA

## LEANDRO CABRAL ZACHARIAS

Efeito da aplicação de acetato de triancinolona sem preservativo (Triesence®) na retina: estudo morfológico, eletrorretinográfico e em cultura de células retinianas.

SÃO PAULO 2013

## LEANDRO CABRAL ZACHARIAS

Efeito da aplicação de acetato de triancinolona sem preservativo

(Triesence®) na retina: estudo morfológico, eletrorretinográfico e em

cultura de células retinianas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa de Oftalmologia

Orientação: Prof. Dr. Walter Yukihiko Takahashi

SÃO PAULO 2013

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zacharias, Leandro Cabral

Efeito da aplicação de acetato de triancinolona sem preservativo (Triesence®) na retina : estudo morfológico, eletrorretinográfico e em cultura de células retinianas / Leandro Cabral Zacharias. -- São Paulo, 2013.

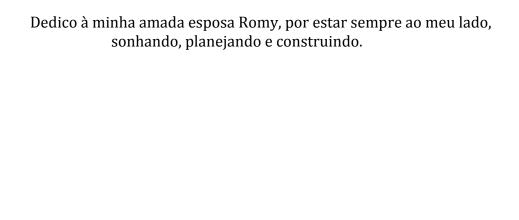
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oftalmologia.

Orientador: Walter Yukihiko Takahashi.

Descritores: 1.Retina 2.Triancinolona/efeitos adversos 3.Injeções intravítreas 4.Proteína glial fibrilar ácida 5.Esteróides 6.Toxicidade de drogas

USP/FM/DBD-097/13

# **DEDICATÓRIA**



Dedico aos meus filhos Bianca, Vinicius e Luisa, por darem sentido e importância a todas as minhas ações

Agradeço aos

meus pais

Idamar e Wagner,

pelo amor,

exemplo de vida e de dedicação.

Agradeço ao

Dr. Walter Takahashi,

meu orientador

pelas orientações prestadas e

por todas as oportunidades dadas

em todos estes anos

Agradeço ao

Dr. Remo Susanna Jr,

pelo exemplo de excelência e liderança.

A minha avó **Idalina**, por todo o carinho que sempre teve por mim.

A minhas irmãs **Cassiana**, **Patrícia e Andreza**, por todo o apoio.

A meus sogros **Emmy e Roger**, pelo apoio familiar inabalável e força de caráter.

Ao meu cunhado **Roger**, pela amizade desde os tempos de faculdade.

A minha cunhada **Ryane**, minha tia **Rejane** e minha tia-avó **Ermide**, também pelo apoio familiar.

Ao **Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro**, pelos conhecimentos transmitidos e amor à instituição.

Ao **Dr Yoshitaka Nakashima**, pelos ensinamentos e companheirismo

Ao **Dr. Francisco Max Damico**, pelo companheirismo e ajuda técnica

A **Dra. Dora Fix Ventura**, por ter tão gentilmente aberto as portas de seu laboratório para realização dos experimentos eletrorretinográficos.

A **Dra. Dânia Emi Hamassaki**, por ter aberto as portas de seu laboratório para as análises histológicas e imunoistoquímicas, assim como me acolheu muitos anos atrás como aluno de iniciação científica, mostrando que muitas vezes os caminhos da vida se entrecruzam.

Ao **Dr. Baruch David Kuppermann**, por ter me dado tantas oportunidades, tanto clínicas, como cirúrgicas e em trabalhos experimentais, durante minha estadia na Universidade da Califórnia- Irvine.

A **Dra Maria C. Kenney**, pelos ensinamentos durante minha estadia na Universidade da Califórnia- Irvine

Aos colegas Maria Fernanda Estrago-Franco, Ashish Sharma, Jayprakash Patil, Claudio Ramirez e Ana Laura Gramajo, fellows da Universidade da Califórnia- Irvine durante minha estada, por todo o suporte nos experimentos em cultura de células

A **Gabriela Yoshimoto e Cristiano Pessôa**, pela ajuda na realização do eletrorretinograma e manipulação de animais.

A **Priscilla Sayame Akamine** por toda a ajuda com a parte imunoistoquímica.

A **Beatriz Sayuri Takahash**i pela ajuda no trato com os animais e por duas décadas de amizade.

A **Balázs Nagy e Mirella Barboni**, pela ajuda na análise estatística e interpretação dos dados.

A **Regina Ferreira de Almeida**, pela força e apoio em todos os passos desde a graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos fornecida.

Aos colegas assistentes do departamento de oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo coleguismo e dedicação

# NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adotado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos, de acordo com of *List of Journals Indexed* in *Index Medicus*.

# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de gráficos e figuras

# Resumo

# Summary

1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Histórico	02
1.2. Esteroides utilizados na prática clínica	04
1.3. Mecanismos de ação	06
1.4. Indicações terapêuticas e efeitos colaterais	09
1.5. Doses utilizadas e formulações	14
1.6. Métodos de determinação da toxicidade retiniana	16
1.7. Justificativa do estudo	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Cultura de células	24
3.2. Exposição ao Triensence ® (TRI)	26
3.3. Determinação da viabilidade celular (VC)	27
3.4. Atividade da caspase 3/7	28
3.5. Potencial de membrana mitocondial (ΔΨm)	30
3.6. Estudos morfológicos e eletroretinográficos	31

3.6.1. Identificação dos grupos	31
3.6.2. Eletroretinograma	32
3.7. Injeções intravítreas	33
3.8. Morfologia e imunohistoquímica	35
3.9. Análise estatística	38
3.10. Eletroretinografia	39
4. RESULTADOS	40
4.1.Viabilidade celular nas culturas tratadas com Triesence® (TRIc)	41
4.2. Viabilidade celular nas culturas tratadas com Triesence® (TRIs)	43
4.3. Atividade da caspase 3/7 em culturas tratadas com sTRI	45
4.4. Potencial de Membrana Miticondrial (ΔΨm) nas culturas	
de células tratadas com TRIs	48
4.5. Eletroretinografia	50
4.6. Morfologia	66
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
8. ANEXOS	119

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TRIc: Triesence® na sua forma comercial, em cristais

μg/mL: microgramas por mililitro

TRIs: Triesence® solubilizado em dimetilsulfuroxido

DMSO: dimetilsulfóxido

VC: Viabilidade celular

ΔΨm: Potencial de membrana mitocondrial

mg: Miligrama

OD: Olho direito

OE: Olho esquerdo

ERG: Eletrorretinograma

 $V_{\rm max}$ : Amplitude máxima da onda b em condições escotópicas

k: Intensidade luminosa neccessária para se atingir 50 por cento do valor

da amplitude máxima da onda b

n: Inclinação da curva composta pelo valor logarítmico da amplitude média

da onda b versus o valor logarítmico da intensidade luminosa

Hz: Hertz

H&E: Hematoxilina-eosina

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

AT: Acetato de triancinolona

DMRI: Degeneração macular relacionada à idade

PIO: Pressão intraocular

COX: Ciclooxigenase

LOX: Lipooxigenase

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

EPR: Epitélio pigmentado da retina

PDT: Terapia fotodinâmica com verteporfina

mmHg: Milimetros de mercúrio

mL: Mililitro

SCORE: Estudo standard of care versus steroid for retinal vein oclusion

DRCR network: Diabetic retinopathy clinical research network

AB: Álcool benzílico

EUA: Estados Unidos da América

Dr.: Doutor

Profa.: Professora

ATCC: American type culture collection

vol/vol: Relação volume por volume

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F12

mM: Milimolar

U/mL: Unidades por mililitro

mg/mL: Miligramas por mililitro

NY: Nova lorque

MEM: Minimum essential medium

°C: Graus centigrados

TRI: Triesence®

rpm: Revoluções por minuto

EDTA: Ácido etilenodiamino tetraacético

Inc.: Incorporation

FLICA: Fluorescent labeled inhibitor of caspases

λ: Comprimento de onda

nm: Nanômetro

msi: Sinal médio de intensidade

Kg: Quilograma

ARVO: The Association for Research in Vision and Ophthalmology

cd.s/m<sup>2</sup>: Candela em segundo por metro quadrado

ISCEV: Sociedade Internacional para Eletrofisiologia Clínica da Visão

*I*: Intensidade luminosa

M: Molar

PB: Tampão fosfato

TdT: Deoxinucleotidil transferase terminal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Tris-HCL: Tri(hidroximetil)aminometano associado a ácido clorídrico

d-UTP: Desoxiuridina 5'-trifosfato

EMS: Electron Microscopy Science

vs.: Versus

 $\mu$ V: Microvolt

ms: Milissegundo

Scot: Escotópico

Phot: Fotópico

ADP: Adenosina difosfato

p: Erro alfa

EP: Erro padrão

Eq: Equivalente

ONL: Camada nuclear externa

INL: Camada nuclear interna

GCL: Camada de células ganglionares

V: Volt

# LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico 1 – Porcentagem de viabilidade celular de células ARPE-19	
expostas ao Triesence ® em cristais (TRIc)	42
Gráfico 2 - Porcentagem de viabilidade celular de células R28	
expostas ao Triensence ® em cristais (TRIc)	42
Gráfico 3- Porcentagem de viabilidade celular de células ARPE-19	
expostas ao Triensence ® solubilizado em DMSO (TRIs)	44
Gráfico 4 - Porcentagem de viabilidade celular de células R28	
expostas ao Triensence ® solubilizado em DMSO (TRIs)	44
Gráfico 5 – Atividade da Caspase 3/7 em células ARPE-19	
expostas ao TRIs	47
Gráfico 6 - – Atividade da Caspase 3/7 em células R 28	
expostas ao TRIs	47
Gráfico 7 – Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) em cultura de célula	as
ARPE-19 tratadas com TRIs	49

Gráfico 8 - Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) em cultura	
de células R28 tratadas com TRIs	49
Gráfico 9 - Análise da amplitude da onda b para cada intensidade	
de estímulo escotópico estudado no grupo recebendo 1 mg	
de Triesence®	51
Gráfico 10 - Análise da amplitude da onda b para cada intensidade	
de estímulo escotópico estudado no grupo recebendo 4 mg	
de Triesence®	51
Gráfico 11 - Análise da amplitude da onda b para cada intensidade	
de estímulo escotópico estudado no grupo recebendo 8 mg	
de Triesence®	52
Gráfico 12 - Análise da amplitude da onda b para cada intensidade	
de estímulo fotópico estudado no grupo recebendo 1 mg	
de Triesence®	59

Gráfico 13 - Análise da amplitude da onda b para cada intensidade	
de estímulo fotópico estudado no grupo recebendo 4 mg	
de Triesence®	60
Gráfico 14 - Análise da amplitude da onda b para cada intensidade	
de estímulo fotópico estudado no grupo recebendo 8 mg	
de Triesence®	61
Gráfico 15 – Análise de Fourrier de diversas frequências de estimulação	
no grupo recebendo 1 mg de Triesence®	63
Gráfico 16- Análise de Fourrier de diversas frequências de estimulação	
no grupo recebendo 4 mg de Triesence®	64
Gráfico 17 - Análise de Fourrier de diversas frequências de estimulação	
no grupo recebendo 8 mg de Triesence®	65

Figura 1 - Curvas relacionando o valor logarítmico da onda b e o valor	
logarítmico do estímulo luminoso em condições escotópicas para animais	
recebendo 1, 4 ou 8 mg de TRI	54
Figura 2: Comparação entre a morfologia retiniana de OD, com 8 mg	
de TRI e OE, tratado com BSS após 30 dias da aplicação	67
Figura 3 – Comparação entre OD e OE para a marcação	
imunoistoquímica com Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)após 7 dias de	
aplicação de Triesence	69
Figura 4 – Marcação para GFAP em OD em diferentes regiões retinianas	
para três animais aleatórios no grupo recebendo 1 mg de Triesence®	
após 7 dias de aplicação	70
Figura 5 - Marcação para GFAP em OD em diferentes regiões retinianas	
para três animais aleatórios no grupo recebendo 4 mg de Triesence®	
após 7 dias de aplicação	71
Figura 6 - Marcação para GFAP em OD em diferentes regiões retinianas	
para três animais aleatórios no grupo recebendo 8 mg de	
Triesence® após 7 dias de aplicação	72
Figura 7 – Quadro comparativo de diferentes regiões retinianas de animais	
submetidos a injeção intravítrea de Triesence ® nas doses de 1, 4 ou 8 mg,	
com marcação de GFAP após 7 dias de aplicação	73

# **TABELAS**

Tabela 1: Valores de V <sub>max</sub> antes (basal) e 30 dias após a aplicação da	
medicação	55
Tabela 2: Valores de K antes (basal) e 30 dias após a	
aplicação da medicação	56
Tabela 3: Valores de <i>n</i> antes (basal) e 30 dias após a	
aplicação da medicação	57

Resumo

### **RESUMO**

EFEITO DA APLICAÇÃO DE ACETATO DE TRIANCINOLONA SEM PRESERVATIVO (TRIESENCE®) NA RETINA: ESTUDO MORFOLÓGICO, ELETRORRETINOGRÁFICO E EM CULTURA DE CÉLULAS RETINIANAS. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. 2013.

**INTRODUÇÃO**: Injeções intravítreas de acetato de triancinolona são utilizadas no tratamento de uma série de doenças retinianas. Estudos *in vitro* demonstram toxicidade, mas não está ainda claro se está relacionada ao preservativo ácido benzílico. Recentemente, uma formulação sem preservativo (Triesence®) foi aprovada nos Estados Unidos da América para uso intraocular. Entretanto, não existem estudos avaliando os efeitos *in vitro* e *in vivo* desta formulação.

**OBJETIVOS**: Avaliar os efeitos do Triesence® em culturas de células retinianas e em um modelo experimental animal.

**MÉTODOS:** As culturas de células ARPE-19 e R28 foram tratadas por 24 horas com Triesence® em cristais (TRIc) nas doses de 1000, 500, 200 ou 100 μg/mL, ou solubilizado (TRIs) nas doses de 1000, 500 ou 200 μg/mL. O Triesence® foi solubilizado após a centrifugação da droga, descarte do sobrenadante contendo o veículo, e em seguida ressuspensão da droga em quantidade equivalente de dimetilsulfóxido (DMSO). A porcentagem de viabilidade celular (VC) foi avaliada em ensaio de exclusão com azul de tripan. O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ m) foi analisado com o ensaio JC1. A atividade da caspase-3/7 foi mensurada por ensaio com fluoróforos.

Trinta coelhos borboletas (Oryctolagus Cuniculum) foram divididos em três grupos e receberam 3 quantidades diferentes de Triesence® intravítreo: 1, 4, ou 8 mg. Após a anestesia, o olho direito (OD) recebeu a droga, enquanto o olho esquerdo (OE) recebeu o mesmo volume de solução salina balanceada. Ao final de 30 dias, o eletrorretinograma (ERG) foi registrado. Após realização do ERG, os animais foram sacrificados e os olhos coletados para análise morfológica. Doze outros coelhos foram submetidos somente a análise morfológica após 7 dias da aplicação. OS ERGs foram registrados com o sistema RETIport (Roland Consult, Alemanha), com um estimulador Ganzfeld Q450 SC. O teste de postos com sinais de Wilcoxon foi utilizado para comparar as amostras relacionadas. Para estímulos escotópicos, o valor logarítmico das amplitudes médias da onda b foi relacionado ao valor logarítmico da intensidade luminosa de cada estímulo, e a amplitude máxima da onda b ( $V_{\rm max}$ ), a intensidade luminosa necessária para se atingir 50% do valor do  $V_{\rm max}$  (k), e a inclinação da curva (n) foram analisados utilizando-se os testes estatísticos ANOVA e t de Student pareado bicaudal.

**RESULTADOS:** TRIc causa diminuição significativa na viabilidade celular em todas as concentrações e linhagens testadas, o que é minimizado pela solubilização da droga. Mesmo o TRIs demonstrou aumento da regulação da caspase 3/7, indicativo de apoptose *in vitro*, mas não houve aumento da atividade no ensaio JC1.

O ERG escotópico evidenciou uma queda estatisticamente significativa de aproximadamente 7% no  $V_{\rm max}$  no grupo recebendo 8 mg a droga, mas não houve alteração significativa nos parâmetros k ou n em nenhuma concentração testada. O ERG fotópico evidenciou amplitudes de onda b significativamente reduzidas nos grupos que receberam 4 ou 8 mg, mas não no que recebeu 1 mg. Observou-se redução na amplitude do flicker para 24 ou 30 Hertz (Hz) no grupo que recebeu 8 mg, e para 30 Hz no grupo que recebeu 4 mg. Não foram notadas diferenças nos ensaios Hematoxilina-Eosina (H&E), Tunnel, Fluoro-Jade B ou GFAP (proteína glial fibrilar ácida) entre retinas tratadas e controle após 30 dias. Entretanto, após 7 dias, observou-se marcação positiva para proteína glial fibrilar ácida nas células de Müller.

**CONCLUSÃO**: TRIc causa uma diminuição significativa na viabilidade celular em culturas de células retinianas. Após solubilizada, a droga não causa este efeito ou tampouco altera o ΔΨm. Mesmo o TRIs causa aumento dos níveis de caspase 3/7, sugerindo apoptose. No modelo experimental em coelhos, foram observadas alterações morfológicas e eletrorretinográficas após a injeção intravítrea de Triesence®. Células de Müller apresentaram expressão de GFAP após 7 dias, mas não após 30 dias, sugerindo ativação transitória deste tipo celular. Não foram encontrados sinais de necrose ou apoptose, mesmo nas doses mais elevadas. Os resultados do ERG sugerem toxicidade retiniana após aplicação intravítrea de 4 ou 8 mg de Triesence® (4 a 8 vezes a dose clínica terapêutica).

Descritores: 1. RETINA 2. TRIANCINOLONA/efeitos adversos 3. INJEÇÕES INTRAVÍTREAS 4.PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA 5. ESTERÓIDES 6. TOXICIDADE DE DROGAS

Summary

#### SUMMARY

# EFFECTS OF PRESERVATIVE-FREE TRIAMCINOLONE ACETONIDE (TRIESENCE®) ON RETINAL CELLS: AN IN VIVO MORPHOLOGIC AND ELETRORETINOGRAPHIC, AND IN VITRO TISSUE CULTURE STUDY

**INTRODUCTION:** Intravitreous triancinolone acetonide is used to treat various retinal disorders. In vitro studies show toxicity, but it is not clear if that is related to the preservative benzyl alcohol. Recently, a formulation without preservative (Triesence®) was approved for intraocular use. However, no *in vitro* or *in vivo* studies with this formulation have been reported in literature so far.

**OBJECTIVES:** To evaluate the effects of the exposure of Triesence® on retinal cells in culture and on an *in-vivo* rabbit model.

**METHODS:** ARPE-19 and R28 cell cultures were treated for 24 hours with 1000, 500, 200 or 100  $\mu$ g/mL of crystalline (TRIc) or 1000, 500 or 200  $\mu$ g/mL of solubilized (TRIs) Triesence®. The drug was solubilized by centrifuging it, discarding the supernatant containing the vehicle and then resuspending the pellet in an equivalent amount of Dimethyl sulfoxide (DMSO). Percentage of cell viability (VC) was evaluated by a trypan blue dye-exclusion assay. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ m) was analyzed with the JC-1 assay. The caspase-3/7 activity was measured by a fluorochrome assay.

Thirty pigmented rabbits (Oryctolagus Cuniculum) were assigned to 3 different intravitreal drug concentrations of Triesence®: 1, 4 or 8 mg. The animals were anesthetized and the right eye (OD) received drug, while the left eye (OS) received balanced salt solution. After 30 days, electroretinogram (ERG) was recorded. ERGs were recorded with the RETIport system (Roland Consult, Germany) with a Ganzfeld Q450 SC stimulator. Wilcoxon signed rank test was used to compare related samples. After the ERG, the animals were euthanized and the eyes were collected for morphological analysis. Twelve other rabbits had histology only analysis after 7 days of injection. Dark-adapted b-wave mean amplitudes were plotted as log response versus log light intensity curves, and the maximum amplitude of the b wave ( $V_{\rm max}$ ), the intensity needed for 50% of  $V_{\rm max}$  (k), and the slope of the function (n), were analyzed with the one-way ANOVA and paired two-tailed Student t-test.

**RESULTS:** TRIc causes a significant decrease in cell viability in all concentrations and cell lines tested, which is minimized by drug solubilization. Even TRIs showed significative caspase-3/7 upregulation, indicative of in vitro apoptosis, but no JC-1

## Summary

activity. Dark-adapted ERGs showed a significant decrease in the  $V_{\rm max}$  at the 8 mg group. Neither k nor n was affected in any doses tested. Light-adapted ERGs had significant smaller b-wave amplitudes in the 4 and 8 mg groups, but not in the 1 mg group. There was a significant reduction in flicker amplitude at 24 and 30 Hz in the 8 mg group and at 30 Hz in the 4 mg group. No difference was observed in Hematoxylin-Eosin (H&E), Tunnel, Fluoro-Jade B or glial fibrillary acid protein (GFAP) between any experimental and control retinas after 30-day injection. However, after 7 days, retinas from the 8 mg group showed GFAP-positive processes of Muller glial cells.

**CONCLUSION:** The crystalline form of Triesence® (TRIc) causes significant decrease in CV to cultured retinal cells. Once the Triesence® is solubilized (TRIs), at the same concentrations, the cells remain viable with no decrease in CV or  $\Delta\Psi m$ . However, even TRIs shows increased caspase-3/7 activity suggesting some degree of apoptosis. Rabbit retinas submitted to intravitreal injections of Triesence® show morphological, as well as ERG changes. GFAP-positive processes were detected after 7 days, and disappeared after 30 days, suggestive of transient Muller cell activation. No signs of apoptosis or necrosis were observed even at the highest dose tested. The ERG results suggest retinal toxicity after exposure to 4 or 8 mg of the drug (four or eight times the clinical dose).

KeyWords: 1. RETINA 2.TRIAMCINOLONE 3.INTRAVITREAL INJECTIONS 4. GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN 5. STEROIDS 6. DRUG TOXICITY

1. Introdução

# 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Histórico

Os corticosteroides são uma classe de drogas utilizadas por diversas vias para o tratamento de doenças oculares há muitos anos, mas mais recentemente passaram a ser administrados diretamente ao segmento posterior ocular para o tratamento de várias doenças.<sup>1-11</sup>

A primeira injeção intravítrea de esteróides data de 1974, quando Graham e Peyman injetaram dexametasona em um modelo experimental de endoftalmite. Subsequentemente, séries de casos foram publicados relatando a combinação de esteróides com gentamicina para o tratamento de endoftalmites bacterianas. 13-15

No final da década de 1970, Machemer e Tano<sup>16,17</sup> demonstraram que uma única injeção de dexametasona em modelos animais inibia o crescimento de fibroblastos e reduzia significantemente a incidência de descolamento de retina. Estes experimentos foram repetidos com o acetato de triancinolona, com resultados similares.<sup>18</sup>

Já na década de 80, Ishibashi e colaboradores, avaliando modelo primata de lesões subretinianas induzidas por fotocoagulação a laser, observou que olhos tratados com dexametasona ou uma combinação de dexametasona e acetato de triancinolona (AT) desenvolviam membranas neovasculares

subretinianas com menos frequência quando comparado a controles submetidos a fotocoagulação a laser sem tratamento adjunto de esteroides, sugerindo efeito antiangiogênico dos mesmos.<sup>19</sup>

Apesar dos estudos experimentais promissores, a utilização intravítrea de glicocorticoides ganhou popularidade apenas mais recentemente. Em 1995, Penfold e colaboradores<sup>20</sup> publicaram estudo piloto avaliando o AT intravítreo para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade (DMRI) na forma exsudativa. Após 18 meses de seguimento, não foi observado nenhum efeito colateral grave e a acuidade visual do grupo tratado foi significantemente melhor do que no não tratado. Estudo similar publicado em 2000, apontava melhora visual após 3 e 6 meses em casos tratados com injeção intravítrea de AT, mas um aumento de pressão intraocular (PIO) foi notado em um quarto dos pacientes.<sup>21</sup>

Bons dados de tolerabilidade levaram a partir da década de 90, a uma difusão das injeções intravítreas de esteroides como modalidade terapêutica para diversas doenças da retina.

## 1.2. Esteroides Utilizados na Prática Clínica

São três os glicocorticoides mais comumente utilizados na prática clínica: dexametasona, acetato de fluocinolona e AT. O AT (9 -fluoro-16 hidroxiprednisolona) apresenta potência antiinflamatória 5 vezes maior que o cortisol (hidrocortisona), enquanto este número chega a 25 vezes para a dexametasona ou a fluocinolona.<sup>22</sup> Quando considerada a concentração máxima após aplicação intravítrea, a dexametasona, por sua alta solubilidade, apresenta 3,0 µg/mL de concentração vítrea máxima, enquanto este número chega apenas a 1,2 µg/mL para o AT<sup>23</sup> e a 0,05 µg/mL para a fluocinolona<sup>24</sup>, de modo que se seguirmos esta lógica, a dexametasona administrada ao segmento posterior deve possuir potência antiinflamatória cerca de 15 vezes maior que o AT, que por sua vez apresenta potência antiinflamatória cerca de cinco vezes maior que a fluocinolona. Entretanto, as meia vidas da dexametasona e da fluocinolona intraocular são extremamente curtas, da ordem de algumas horas, 25 e seu uso terapêutico em doenças retinianas ou inflamatórias crônicas, onde uma ação antiinflamatória é desejada por períodos mais prolongados, exige a utilização de dispositivos de liberação lenta, como o caso do Retisert TM (implante de liberação lenta de fluocinolona)<sup>26</sup> ou do Ozurdex®<sup>27</sup> (implante de liberação lenta de dexametasonana), já disponíveis comercialmente na atualidade em vários países.

Ao contrário da dexametasona, o AT é pouco solúvel em água e apresenta ação farmacodinâmica residual na cavidade vítrea por até nove meses, como comprovado em um modelo experimental de coelhos pigmentados.<sup>28</sup> Em estudo experimental que consistia na indução de retinopatia pela aplicação intravítrea de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em coelhos (causando vasodilatação, aumento da tortuosidade vascular, edema da retina interna constatado à tomografia de coerência óptica e extravazamento angiofluoresceinografia), vascular ao exame de diferentes esteroides apresentaram ação farmacodinâmica variáveis. Enquanto a aplicação intravítrea de dexametasona suprimia a retinopatia induzida por três dias, uma única aplicação intravítrea de 2 mg de AT conseguiu neutralizar a retinopatia por até 45 dias<sup>29</sup>. demonstrando *in vivo* as diferencas de farmacodinâmica entre os dois esteroides.

Os efeitos mais prolongados do AT são obtidos através da liberação constante de pequenas quantidades oriundas de seu depósito cristalizado, gerando efeitos antiinflamatórios, antiproliferativos, antiangiogênicos e antipermeabilidade mais longos quando comparado a outras preparações de esteroides.<sup>30</sup>

## 1.3. Mecanismos de Ação

Os glicocorticoides são potentes drogas antiinflamatórias, agindo na inibição da fosfolipase A2 e em diversos pontos da via do ácido aracdônico. A cascata inflamatória tem início com a ativação da enzima fosfolipase-A2. Devido a uma série de diferentes estímulos que geram um aumento de influxo de cálcio intracelular e sua fosforilação, esta enzima hidroliza o ácido graxo dos fosfolípides da membrana celular, liberando o ácido aracdônico. Este composto é um derivado do ácido linoleico, que no organismo humano se encontra nos fosfolipídeos da membrana celular, e é oxidado em duas vias principais: a dependente de ciclo-oxigenase (COX) e a dependente de lipo-oxigenase (LOX), gerando como produtos derivados eucosanoides.<sup>31</sup>

Os compostos da família das prostaglandinas e leucotrienos são conhecidos como eucosanoides por serem derivados dos ácidos graxos essenciais de vinte carbonos, que contém três, quatro ou cinco ligações duplas, e são os dois principais agentes das cadeias inflamatórias. A síntese de prostaglandinas é realizada por um complexo de enzimas microssomais, sendo a primeira destas enzimas conhecida como ciclo-oxigenase dos ácidos graxos. (COX-1 e 2).<sup>32</sup> A COX-1 é constitutiva da maioria dos tecidos humanos, mas apresenta especial relevância para a mucosa gástrica, endotélio vascular, parênquima renal e plaquetas. Já a COX-2 é uma enzima de expressão

induzível por mediadores pró-inflamatórios em macrófagos e monócitos. A via da LOX é a segunda via que, com a da COX, formam a cascata do ácido aracdônico, e seu principal produto são os leucotrienos, potentes agentes pró-inflamatórios e com acentuada ação de aumento da permeabilidade vascular.<sup>31</sup>

Os glicocorticoides exercem sua ação antiinflamatória ao induzirem a síntese de uma enzima denominada lipocortina 1, que inibe tanto a fosfolipase-A2 (gerando uma diminuição na formação de prostaglandina, leucotrienos e compostos correlatos) como a COX-1/2, apresentando portanto ação antiinflamatória potente e inespecífica. No ser humano, o principal glicocorticoide endógeno é o cortisol.<sup>22</sup>

Além dos efeitos antiinflamatórios, os esteroides apresentam propriedades antiangiogênicas, antifibróticas e de melhora da permeabilidade vascular. No globo ocular, os efeitos principais dos esteroides se relacionam à estabilização da barreira hematorretiniana, e à inibição do estímulo inflamatório. Uma série de mecanismos de ação já relacionados aos esteroides explicam a estabilização da barreira hematorretiniana, incluindo a estabilização de membranas lisossomais e celulares, redução da produção de eucosanoides, inibição da migração celular de macrófagos e polimorfonucleares ao tecido afetado<sup>33-36</sup>, combinado ao aumento da expressão de proteínas juncionais em células do endotélio

retiniano.<sup>37</sup> A estabilização da barreira hematoretiniana explica a melhora do edema macular observado após a administração intravítrea de esteroides.

Com relação ao AT, sabe-se que este diminui o extravazamento vascular<sup>38</sup>, reduz a secreção de VEGF pelas células do epitélio pigmentado da retina (EPR) durante stress oxidativo<sup>39</sup>, inibe a expressão do gene sintetizador de VEGF em células da musculatura lisa de vasos<sup>40</sup>, e reduz dramaticamente a concentração vítrea de VEGF em pacientes portadores de retinopatia diabética proliferativa.41 Adicionalmente, o AT regula negativamente a expressão de moléculas de adesão endotelial envolvidas em processos inflamatórios<sup>42</sup> e inibe a interação leucócito-endotélio na retina de ratos diabéticos. 43 Todos esses efeitos são regulados por modulações genômicas ou pós translacionais, e são observados após várias horas do tratamento. Entretanto, evidências demonstram início da redução do edema macular a partir de uma hora após a realização de aplicações intravítreas. 44 Por sua ação se iniciar após intervalo tão curto, acredita-se que o AT aja, pelo menos parcialmente, através de vias não genômicas, ou seja, da ativação de cascatas de sinalização através de alterações das propriedades fisicoquímicas das membranas celulares sem envolvimento direto de receptores de glicocorticoide.<sup>44</sup>

## 1.4 Indicações terapêuticas e efeitos colaterais

Por sua ação duradoura na cavidade vítrea e ação antiinflamatória e de estabilização da barreira hematorretiniana, o uso intravítreo do AT já foi relatado em diversas doenças. Quadros inflamatórios tais como a retinocoroidopatia de Birdshot<sup>45</sup>, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada<sup>46</sup>, coroidopatia serpinginosa<sup>47,48</sup>, ou a oftalmia simpática<sup>49</sup>, e patologias relacionadas a uma quebra da barreira hematorretiniana com edema macular associado, tais como a síndrome de Irvine-Gass (edema macular no pós operatório de cirurgia de catarata)<sup>50</sup>, oclusões venosas com edema macular<sup>51</sup>, edema macular diabético<sup>52,53</sup>, retinopatia diabética proliferativa<sup>54</sup>, edema cistoide pós transplante de córnea<sup>55</sup>, retinopatia ou papilopatia relacionadas à radiação<sup>56,57</sup>, casos de telangiectasia macular idiopática<sup>58</sup>, ou o até casos de edema macular associado à síndrome da recuperação imunológica em pacientes imunodeprimidos<sup>59</sup>, estão entre as doenças já relatadas tratadas com injecão intravítrea de AT.

O AT é também comumente utilizado no tratamento da DMRI exsudativa em associação à terapia fotodinâmica com verteporfina (PDT). A associação com AT diminui a necessidade média de retratamentos e melhora a acuidade visual final após seguimento médio de 12 meses em pacientes com membranas neovasculares ocultas, clássicas ou minimamente clássicas secundárias a

degeneração macular, provavelmente pela inibição da inflamação gerada pela terapia fotodinâmica no tecido subretiniano. 60,61

Diversos ensaios clínicos foram conduzidos com o objetivo de testar a eficácia do AT intravítreo no tratamento do edema macular. O grupo americano de pesquisas clínicas em diabetes (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, ou DRCR network) comparou pacientes diabéticos com edema macular submetidos a fotocoagulação a laser ou a injeções intravítreas de 1 ou 4 mg de AT. Após 3 anos de seguimento, a acuidade visual se revelou ligeiramente melhor no grupo submetido a fotocoagulação quando comparado aos recebendo AT. Baseando-se nestes resultados funcionais, o estudo conclui não haverem benefícios a longo prazo para o uso de AT no tratamento do edema macular diabético. 62 Outro estudo desta mesma rede de colaboração em pesquisa randomizou 854 olhos com edema macular diabético a aplicação de ranibizumabe intravítreo associado ou não a fotocoagulação a laser, AT intravítreo associado a laser, ou somente fotocoagulação a laser. Os grupos recebendo ranibizumabe intravítreo, com ou sem fotocoagulação a laser associada, apresentaram melhor acuidade visual final após 2 anos de seguimento, quando comparados aos grupos recebendo AT ou somente fotocoagulação a laser. Entretanto, em olhos pseudofácicos o AT apresentou resultados similares ao ranibizumabe e superiores à fotocoagulação a laser isolada.63

No estudo SCORE (Standard of Care versus Steroids for Retinal Vein Occlusion), pacientes com edema macular secundários a oclusões venosas foram randomizados receberem para 0 tratamento convencional (fotocoaquiação em grade no caso das oclusões de ramo ou observação nas oclusões de veia central da retina) ou injeções repetidas de 1 ou 4 mg de AT. Todas as modalidades de tratamento foram efetivas em melhorar a acuidade visual em pacientes com edema macular secundário a oclusão de ramo venoso após 12 meses de acompanhamento: um ganho de 15 letras quando comparado à medida basal foi encontrado em 29% dos pacientes após fotocoagulação a laser, e em 26 e 27% dos pacientes submetidos a injeções intravítreas de 1 ou 4 mg de AT, respectivamente. Devido à maior incidência de catarata e aumento da PIO no grupo submetido a injeções de esteróides, os autores não recomendaram este tipo de intervenção em casos de edema macular secundários a oclusão de ramo venoso.<sup>64</sup>

Com relação ao edema macular secundário a oclusão de veia central da retina, injeções intravítreas de AT se mostraram superiores à conduta expectante. O tratamento com injeções intravítreas de 1 ou 4 mg de AT resultou em um ganho de 15 letras em 27% e 26% dos pacientes após 12 meses de acompanhamento, contra apenas 7% no grupo observacional. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com esteroides, mas os efeitos adversos locais (elevação da PIO e surgimento de catarata) foram mais frequentes no grupo recebendo 4 mg de AT. Consequentemente, os

investigadores recomendaram a utilização de injeções repetidas de 1 mg de AT no tratamento do edema macular secundário a oclusões de veia central da retina. 65

Além das suas utilizações terapêuticas, o AT também é utilizado em cirurgias do segmento anterior para se evidenciar o vítreo prolapsado em casos de ruptura da cápsula posterior da lente ou frouxidão zonular<sup>66,67</sup>, e durante cirurgias de vitrectomia posterior via pars plana para se evidenciar bandas vítreas<sup>68-70</sup>, membranas epirretinianas<sup>70</sup>, ou a própria membrana limitante interna.<sup>71</sup>

Diversos efeitos colaterais secundários à injeção intravítrea de AT já foram relatados. Dentre os menos frequentes, cita-se a ativação de coriorretinopatia placóide posterior aguda sifilítica<sup>72</sup>, a exacerbação das manifestações clínicas de casos de coriorretinopatia central serosa<sup>73</sup>, ou o rompimento agudo de bolha de cirurgia filtrante.<sup>74</sup> Quadro de maculopatia associada a injeções intravítreas de AT, composto por cristais iridescentes na superfície retiniana sobre a fóvea ou com distribuição em anel ao redor da região macular, já foi descrito mas não parece afetar a função visual.<sup>75</sup>

As complicações mais relatadas após injeção intravítrea de AT incluem a endoftalmite, descolamento de retina, rasgaduras retinianas, hemorragia vítrea, além de aumento da PIO e formação de catarata.<sup>76-8</sup> Bakri (2003) relatou que

após 12 semanas da injeção intravítrea, 49% dos olhos demonstram aumento da pressão de 5 mmHg ou mais, e 28% apresentam elevação maior ou igual a 10 mmHg. <sup>78</sup> Jonas (2003) notou que 50% dos olhos apresentavam elevação de PIO após 1 a 2 meses da aplicação. Na maioria dos casos, a PIO voltava aos níveis basais em até seis meses. <sup>77</sup> Wingate (1999) notou em 32% dos olhos uma elevação de ao menos 5 mmHg após dois meses. <sup>76</sup> Na maioria das séries, houve controle adequado da PIO com o uso de hipotensores tópicos; entretanto, alguns casos relatados na literatura necessitaram de trabeculectomia ou até vitrectomia para remoção da triancinolona. <sup>79</sup>

A formação de catarata é frequente em pacientes submetidos a injeção intravítrea de AT. O DRCR network, em um estudo comparando fotocoagulação a laser e AT intravítreo para o tratamento do edema macular diabético, relatou que 83% dos olhos fácicos no início do estudo e que receberam 4 mg de AT necessitaram de facectomia em um seguimento de três anos, contra 31% dos pacientes fácicos que receberam somente o tratamento a laser.<sup>80</sup>

A endoftalmite bacteriana aguda pode ocorrer após injeção intravítrea de AT. Mosfeghi (2003), em estudo multicêntrico envolvendo 922 aplicações, encontraram endoftalmite no primeiro mês após aplicação em 0,87% dos pacientes. Os fatores predisponentes identificados nos oito pacientes acometidos foram: diabetes mellitus não insulino dependente (em cinco casos);

injeção para mais de um paciente utilizando o mesmo frasco de AT (em dois casos), bolhas filtrantes (um caso), e blefarite (um caso).

O diagnóstico diferencial da endoftalmite infecciosa é com a estéril; esta apresenta frequência em torno de 0.1 a 23.8% das injeções de AT realizadas.<sup>82-87</sup> A diferenciação entre o quadro infeccioso e o asséptico pode não ser óbvia, mas geralmente este último tem início mais precoce, melhor acuidade visual à apresentação, ausência de dor ou quemose, ausência de crescimento em culturas, e melhor acuidade visual final. Evidências científicas sugerem que uma reação tóxica seja desencadeada pelo preservativo ácido benzílico (AB), uma vez que a prevalência de pseudoendoftalmite é reduzida (mas não totalmente evitada) pela utilização intravítrea de formulações livres de preservativo.<sup>88,89</sup> Além disto, em pacientes com pseudoendoftalmite, o quadro inflamatório parece ser mais brando quando formulações sem preservativo são utilizadas.<sup>89</sup>

#### 1.5. Doses utilizadas e formulações

Não existe uma dose correta pré-determinada para a aplicação intravítrea de AT. Diferentes doses já foram relatadas, variando de 1 mg a 25 mg. Nos Estados Unidos da América e no Brasil, a dose de 4 mg (0,1 mL) é a mais comumente utilizada, enquanto que na Alemanha, utilizam-se doses entre 20 e 25 mg,<sup>2,55</sup> conseguida por filtração e concentração da preparação de AT.

O Kenalog® (Brystol-Meyers-Squibb, Princeton, Nova Jersey), inicialmente desenvolvido para uso intra-articular ou intramuscular, ainda é uma formulação de AT muito utilizada para uso intraocular, mesmo após advertência do fabricante, que não se responsabiliza por usos da medicação em indicações não aprovadas na bula. Seu veículo contém, além do cloreto de sódio (para manter uma osmolaridade isotônica), AB a 1,0% como preservativo e agente bactericida, carboximetilcelulose sódica a 0,75% para aumento de viscosidade e distribuição da suspensão, e polissorbato a 0,04% também como preservativo. 90

O Triesence®, formulação sem preservativo aprovada em 2007 nos Estados Unidos da América para uso intraocular, apresenta concentração de 40 mg/mL de AT, e seu veículo apresenta cloreto de sódio para manter isotonicidade, além de carboximetilcelulose sódica a 0,5% e polisorbato 80 a 0,02%, não havendo portanto em sua composição o composto AB.<sup>91</sup> Foi considerado seguro e eficaz na visualização do vítreo durante cirurgias de vitrectomia posterior, com ou sem remoção de membranas epirretinianas.<sup>92</sup>

O Trivaris<sup>TM</sup> é uma formulação de AT sem preservativo aprovada nos Estados Unidos da América para uso intraocular em 2008. Esta formulação contém 8 mg de AT em 0,1 mL (80 mg/mL), e utiliza um gel denominado Hyladur<sup>TM</sup> como veículo. Foi utilizada em ensaios clínicos randomizados, tais como o que avaliou a eficácia de esteróides no tratamento do edema macular secundário a oclusões vasculares retinianas (SCORE)<sup>64,65</sup>, e diversos protocolos

da rede americana de colaboração em pesquisa DRCR network. 62,63,80 Entretanto, esta formulação não é disponível comercialmente.

## 1.6. Métodos de determinação da toxicidade retiniana

A determinação da toxicidade de determinada droga a células da retina pode ser pesquisada por diversos ensaios. A viabilidade celular (VC) avalia a porcentagem de células viáveis em relação ao total de células presentes. Esta determinação pode ser conseguida através de incubação com o corante azul de tripan: células que apresentam estrutura intacta não permitem a entrada do corante, enquanto que células que apresentam membranas celulares comprometidas se coram de azul, permitindo a contagem e determinação da VC.93 No entanto, como muitas medicações (como o caso do AT) apresentam efeito duradouro, e os modelos de exposição a drogas in vitro não permitem a manutenção de células em cultura por períodos prolongados, métodos mais sensíveis, que possam detectar alterações celulares mais precoces, são úteis para a determinação de toxicidade celular inicial, antes que ocorra diminuição da VC. Alguns ensaios, como a medida da atividade de caspase 3/7, 94-97 avaliam o nível de apoptose em determinada população celular após exposição a drogas; outros ensaios, como a medida dos níveis de desidrogenase mitocondrial ou do

potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta \Psi m$ ), <sup>93</sup> avaliam a função desta organela, visto que na mitocôndria se inicia o processo de muitas vias de apoptose. <sup>98</sup>

Para a avaliação da toxicidade retiniana in vivo, pode-se lançar mão de testes eletroretinográficos ou testes morfológicos e imunoistoquímicos. O eletrorretinograma (ERG) é um método bastante difundido para se avaliar a função retiniana em animais.<sup>29, 99-107</sup> As respostas ao ERG de campo total representam a função retiniana como um todo, em especial as funções das células bipolares e fotorreceptores. A amplitude máxima das ondas a e b são frequentemente utilizadas na correlação entre o número de fotorreceptores e o estágio de determinada afecção. Mudanças na amplitude de ambas as ondas a e b são proporcionais a perdas de fotorreceptores. 108 Os testes escotópicos primariamente refletem a função de bastonetes, enquanto o ERG fotópico reflete principalmente a função de cones. Quando adaptado ao escuro, flashes de intensidade leve a moderada ocasionam ativação dos bastonetes, enquanto os cones são avaliados com o animal adaptado ao claro e submetidos a flashes mais intensos; a estimulação tipo flicker também é utilizada para a avaliação da função dos cones. A fim de tornar consistentes os testes em todo o mundo, a Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica e Visão (ISCEV)<sup>109</sup> propôs um protocolo de estimulação, visando a análise em separado de cones e bastonetes.

Com relação à análise histológica, o corante Hematoxilina-Eosina (H&E) é utilizado bastante para avaliação da morfologia а retiniana. 97,100,103,104,106,107,110,111,112 A análise imunoistoquímica pode auxiliar na determinação de necrose ou apoptose tecidual, ou até inferir a ocorrência de "stress" tecidual. O TUNEL (in situ terminal deoxynucleotidyl transferasemediated (TdT) dUTP-biotin nick-end labeling), é um ensaio consolidado para determinar a presença de fragmentos de DNA presentes nas cascatas de apoptose, e baseia-se na determinação dos fragmentos de DNA pela enzima TdT, que cataliza a incorporação de desoxiuridina 5'-trifosfato (d-UTPs) marcados com fluoróforos. 113,114

O ensaio Fluorojade-B é utilizado para a identificação de necrose celular.

O corante Fluoro-Jade B é um derivado aniônico tribásico da fluoresceína, apresentando perfil de excitação e emissão muito similares à própria fluoresceína (excitação: 495 nm; emissão:521 nm), podendo portanto ser analisado utilizando-se os mesmos filtros excitação e barreira. Este ensaio é bastante utilizado para determinação de tecido neuronal em necrose. 115-7.

A expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) pode também ser utilizada como marcador de sofrimento tecidual. As células de Müller se tornam reativas em resposta a muitos processos patológicos retinianos. Esta reação, denominada gliose das células de Müller, é um dos componentes de um processo retiniano complexo em resposta a qualquer "stress", que envolve

ativação da microglia, alterações vasculares e migração de leucócitos aos tecidos retinianos. A resposta mais sensível e não específica a lesões retinianas é o aumento da regulação da GFAP. Esta proteína é um filamento intermediário normalmente expresso em astrócitos, mas não nas células de Müller. Entretanto, em uma série de alterações retinianas, tais como descolamento de retina 122, isquemia 123, ou aumento da pressão intraocular 124, a expressão de GFAP pelas células de Müller torna-se aparente. Desta maneira, considera-se a expressão de GFAP pelas células de Müller como um indicador molecular de "stress" retiniano, e alguns autores consideram a imunoistoquímica para GFAP mais sensível em se detectar "stress" retiniano que o ERG ou observações histológicas com a microscopia óptica. 125

### 1.7. Justificativa do estudo

A toxicidade do AT a células retinianas já foi demonstrada *in vitro*<sup>93-97, 110</sup> e em estudos morfológicos em coelhos.<sup>112</sup> Dados eletrorretinográficos são inconclusivos, uma vez que alguns trabalhos demonstram toxicidade<sup>99</sup>, enquanto outros concluem ser seguro para uso intraocular.<sup>100,101</sup> O mecanismo de toxicidade ainda necessita ser determinado: enquanto alguns autores atribuem a toxicidade ao uso do preservativo AB<sup>99,102,126</sup> (e portanto recomendam a utilização de formulações sem preservativo), outros consideram que o contato

direto dos cristais de AT às células retinianas seja o responsável pela morte celular. 30,110,127

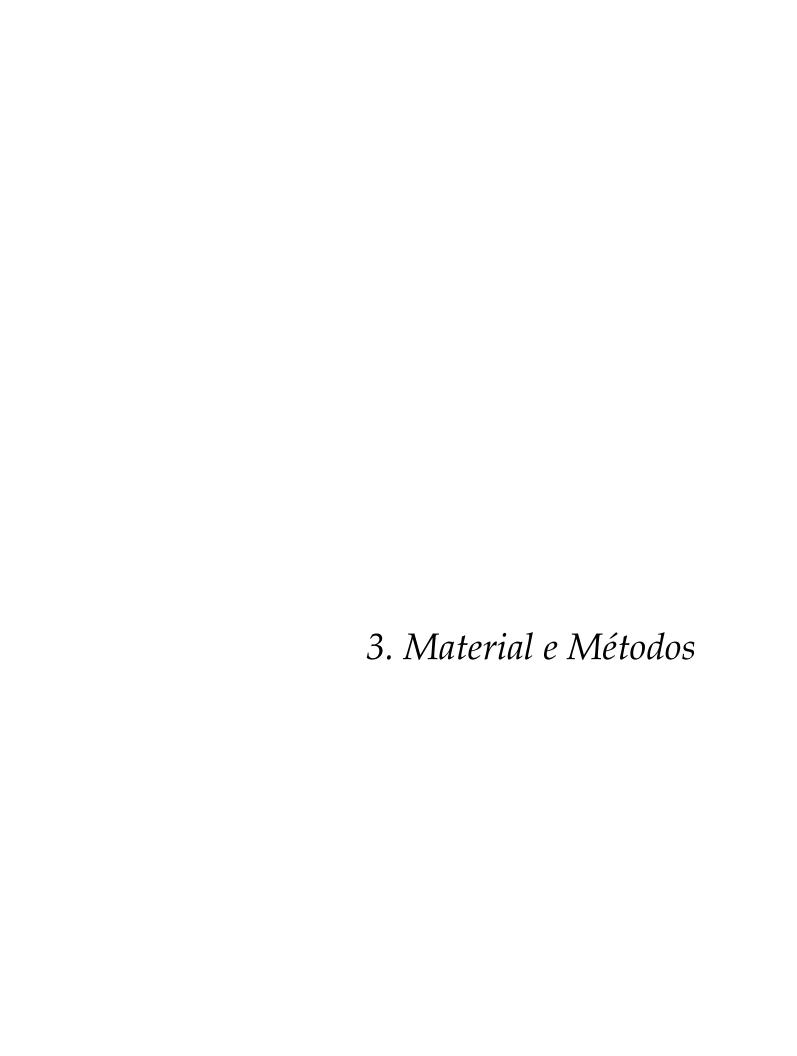
Apesar de terem composições e concentrações semelhantes à exceção da presença ou ausência do preservativo AB, estudo recente demonstra farmacocinética e farmacodinâmica bastante distintas quando considerado diferentes formulações de AT. Em olhos de coelhos pigmentados, o Kenalog® permanence na cavidade vítrea e inibe a retinopatia induzida por VEGF por mais tempo quando comparado a outras formulações como o Triesence®. <sup>28</sup> Os cristais de AT apresentam tamanho maior para o Kenalog® quando comparado ao Triesence® (47µm versus 26µm para o percentil 90 do volume de distribuição), e este dado provavelmente explica como formulações semelhantes, com concentração idêntica de cristais, podem ter diferentes comportamento *in vivo* bastante heterogêneo. <sup>28</sup> Seguindo-se esta linha de raciocínio, não se pode extrapolar o padrão de toxicidade *in vitro* e em modelos experimentais *in vivo* da formulação de AT Kenalog® para a formulação Triesence®.

Apesar das inúmeras evidências demonstrando a toxicidade *in vitro* do Kenalog® e dos dados conflitantes em estudos experimentais *in vivo* para esta mesma formulação, a toxicidade *in vivo* ou *in vitro* do Triesence® não havia sido relatada no início deste estudo.

2. Objetivos

## 2. OBJETIVOS:

- 1) Determinar os efeitos da exposição do Triesence®, uma formulação de acetato de triancinolona para uso intraocular, em duas culturas diferentes de células retinianas: R28 e ARPE-19;
- 2) Determinar os efeitos morfológicos e eletrorretinográficos da injeção intravítrea de Triesence® em modelo experimental de coelhos pigmentados.



# 3. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental dividido em duas etapas. Na primeira, foi realizada a exposição da medicação em modelo experimental *in vitro*, em cultura de células retinianas. Estes experimentos foram realizados na Universidade da California- Irvine, no laboratório do Dr. Baruch David Kuppermann.

Na segunda etapa, olhos de coelhos pigmentados foram submetidos a testes eletrorretinográficos e imunoistoquímicos, no laboratório de Psicologia Experimental da Universidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Dora Fix Ventura, e no departamento de Biologia Celular da Universidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Dânia Emi Hamassaki.

#### 3.1. Cultura de células

As células ARPE-19, uma linhagem de células imortalizadas do EPR humano, foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virgínia, EUA). As células proliferaram em meio de cultura que consistia em mistura de 1:1 (vol/vol) do meio modificado de Dulbecco e do meio F-12 da mistura nutriente de Ham (DMEM F-12; Invitrogen-Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA), 10 mM 1X de aminoácidos não-essenciais, bicarbonato de sódio a 0,37%, L-glutamina a 0,058%, soro bovino fetal a 10%, e antibióticos

(penicilina G 100 U/mL, sulfato de estreptomicina a 0,1 mg/mL, gentamicina 10 mg/mL, anfotericina B 2,5 mg/mL).

As células R28. consideradas células precursoras retina da neurossensorial de ratos, foram derivadas da retina do sexto dia de vida pós natal e cedidas pelo laboratório da Dra Gail Seigel (University of Buffalo, Nova lorque, EUA). 128 As células R28 expressam características genéticas relacionadas a neurônios<sup>129</sup>, assim como propriedades funcionais neuronais.<sup>130</sup> As células R28 foram cultivadas em meio modificado de Dulbecco, glicose (DMEM high glucose; Invitrogen-Gibco) com 10% de soro fetal bovino, 1X meio essencial mínimo (MEM), 10mM 1X de aminoácidos não-essenciais, bicarbonato de sódio a 0,37%, e gentamicina a 10 mg/mL.

Antes de serem expostas à droga, as células foram semeadas em placas de cultura com 6 poços em cada placa, e incubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80-90% de confluência, quando então foram então transferidas a meio sem soro por 24 horas com o objetivo de manter as células em estado séssil não proliferativo, similar ao encontrado na retina *in vivo*.

### 3.2. Exposição ao Triesence®

As culturas de células ARPE-19 e R28 foram tratadas por 24 horas com as seguintes concentrações de Triesence® cristalino (TRIc): 100, 200, 500 e 1000 mg/mL, e foi realizada a análise da VC. Com o intuito de se observar o papel dos cristais de TRI na toxicidade, ambas as culturas de células foram tratadas por 24 horas com a droga solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) (TRIs), nas concentrações de 200, 500 e 1000 mg/mL. A solubilização foi obtida através de centrifugação da medicação a 5000 revoluções por minuto (rpm) em centrífuga por 1 minuto e o sobrenadante contendo o veículo foi descartado. O depósito contendo a medicação foi rentão ressuspendido em quantidade identica de DMSO, a fim de se obter a mesma concentração da droga comercial.

Ambas as linhagens celulares foram encubadas por 24 horas nos mesmos meios de cultura adicionados a DMSO como controle. Para as doses equivalentes de 1000 mg/mL, 500 mg/mL e 200 mg/mL, 250 mL, 125 mL e 50 mL de DMSO foram respectivamente adicionados a cada mL de meio de cultura, representando a mesma quantidade de solvente utilizada para solubilizar a droga nas concentrações testadas. Foram realizados os seguintes ensaios tanto para TRIs como para os controles tratados com DMSO: determinação da VC, atividade da caspase 3/7 e ΔΨm.

## 3.3. Determinação da Viabilidade Celular

Para a determinação da VC, as células foram removidas das placas com 6 poços através de incubação com tripsina- ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 0,2% a 37°C por 5 minutos. Antes da tripsinização, o meio original em cada poço foi transferido para tubos estéreis de centrifugação de 15 mL (Corning Incorporation, Corning, Nova Iorque, EUA) com o objetivo de incluir as células já destacadas na contagem de viabilidade celular. Os tubos de 15 mL contendo as células em suspensão e o meio com as células destacadas foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado, e o aglomerado celular foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultura. Em seguida, foi realizada a análise automatizada da VC (ViCell™ analyzer; Beckman Coulter Inc., Fullerton, Califórnia, EUA). O aparelho realiza um ensaio de exclusão automatizada pelo método do azul de tripan (células com a membrana plasmática comprometida permitem a entrada do azul tripan e são identificadas coradas de azul pelo analizador), fornecendo a porcentagem de VC.

## 3.4. Atividade da Caspase 3/7

A quantificação da atividade da caspase 3/7 foi realizada utilizando-se kits de detecção (Carboxyfluorescein **FLICA Apoptosis** Detection Kits: Immunochemistry Technologies LLC, Bloomington, Minessota, EUA). As sondas de detecção FLICA (Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases) são compostas por uma sequência de peptídeos, a fluorometilcetona, que facilita a ligação irreversível entre a enzima caspase ativada e um marcador fluorescente. Este marcador apresenta um pico de excitação entre 488 e 492 nanômetros (nm) e uma emissão entre 515 e 535 nm. A apoptose foi quantificada pelo nível de fluorescência das sondas FLICA se ligando à caspase. Células que não estejam em apoptose não aparecem marcadas, enquanto que as células em apoptose apresentam forte fluorescência. A atividade da caspase foi medida como a média do sinal de intensidade da fluorescência em determinada área demarcada- Sinal Médio de Intendidade (msi).

Após 24 horas de incubação com a medicação (TRI), as células foram lavadas com meio de cultura, que foi substituído por 300 mL por poço da solução FLICA adicionada a meio de cultura, e foram incubadas por uma hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram em seguida lavadas com tampão fosfato. A atividade da caspase 3/7 foi medida em msi. Os seguintes controles foram incluídos: células das linhagens ARPE-19 e R28 sem serem incubadas com o FLICA a fim de se excluir autofluorescência das próprias células; células ARPE-19 e R28 não tratadas com medicação e incubadas com FLICA para comparação da atividade de caspase com relação às células tratadas com a droga; poços das placas de cultura celular com apenas tampão fosfato, representando a fluorescência de fundo, além de células de ambas as linhagens estudadas tratadas com DMSO a fim de se determinar o efeito do composto utilizado para solubilizar a droga na indução de apoptose. A intensidade de fluorescência foi determinada por uma Unidade de Escaneamento de Imagens Fluorescentes (excitação: comprimento de ondas (λ) de 488 nm, emissão: λ de 520 nm; FMBIO III; Hitachi).

#### 3.5. Potencial de membrana mitocondrial

A detecção dos valores do ΔΨm foi realizada através do kit de detecção do potencial de membrana mitochondrial JC-1 (Biotium, Hayward, Califórnia, EUA). O JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolil-carbocianina) é um corante catiônico que acumula se agregando nas membranas mitocondriais de células sadias, resultando em fluorescência avermelhada (590 nm). As células deterioradas, que apresentam valores de potencial de membrana mitocondrial menores, demonstram fluorescência esverdeada (529 nm). A relação de vermelho (células saudáveis) e verde (células lesadas) foi medida em cada amostra. O sinal de fluorescência foi determinada por uma Unidade de Escaneamento de Imagens Fluorescentes (FMBIO III; Hitachi) programada para a detecção de emissões de luz verde (510-525nm) ou vermelha (590nm). A relação de fluorescência vermelho/verde foi calculada e os dados foram analisados através do teste t de Student não pareado.

## 3.6. Estudos morfológicos e eletrorretinográficos

## 3.6.1. Identificação dos grupos e desenho do estudo

Quarenta e dois coelhos borboleta machos (*Oryctolagus cuniculum*), com peso entre 2,0 e 2,5 quilogramas (Kg), foram utilizados neste estudo. Todos os procedimentos experimentais seguiram as resoluções da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) relativas à experimentação animal. Os coelhos foram mantidos em ciclos de 16/8 horas (hs) de claro-escuro, com alimentação e hidratação livres.

Os coelhos foram divididos em dois grupos principais. No primeiro grupo, 30 coelhos foram subdivididos em três grupos de 10 coelhos em cada grupo, e utilizados tanto nos experimentos eletrofisiológicos como nos morfológicos, após 30 dias da injeção da droga. Cada subgrupo recebeu uma determinada concentração de TRI em seu OD (1,0, 4,0 ou 8,0 mg) e o mesmo volume de BSS no OE. Foi realizado ERG antes da aplicação da droga e após 30 dias.

O segundo grupo foi composto por 12 coelhos utilizados somente para estudos morfológicos, sendo sacrificados após 7 dias da aplicação da medicação. Cada subgrupo de 4 coelhos em cada grupo recebeu uma determinada concentração de TRI em seu OD (1,0, 4,0 ou 8,0 mg) e o mesmo volume de BSS no OE.

## 3.6.2. Eletrorretinograma

Antes da realização do ERG e da aplicação intravítrea, os coelhos foram anestesiados através de injeção intramuscular de mistura contendo hidrocloreto de Ketamina (50 mg/Kg de peso corpóreo) e xilazina (6,7 mg/Kg de peso corpóreo). As pupilas foram dilatadas com tropicamida a 1% e anestesia tópica com propacaína a 0,5% utilizada para reduzir o desconforto dos animais. Os animais foram adaptados ao escuro por 30 minutos antes da realização dos estímulos escotópicos, e adaptados ao claro por 5 minutos à luz antes da realização dos estímulos fotópicos e flicker. As respostas ao estímulo luminoso foram coletadas simultaneamente nos dois olhos, utilizando-se eletrodos corneanos ERG jet acoplados a lente de contato, protegendo-se a córnea com metilcelulose a 0,5%. Os eletrodos referência foram incorporados à mesma lente, de modo a manter contato com a conjuntiva bulbar do coelho durante o experimento. O eletrodo terra foi posicionado na orelha do animal, após o local ser meticulosamente limpo com álcool, sendo estabilizado por pasta condutora. A estimulação elétrica foi obtida utilizando-se o estimulador Ganzfeld Q450 SC acoplado ao sistema de aquisição RETIport (Roland Consult, Germany). Foram seguidos os padrões e protocolos modificados da ISCEV revisado em 2008<sup>109</sup>, para a realização dos experimentos. Para os estímulos escotópicos, foi realizado a seguinte seguencia de estimulação: 0,001 candela em segundo por metro

quadrado (cd.s/m²), 0,01 cd.s/m², 0,1 cd.s/m², 1 cd.s/m², e 10 cd.s/m². Após a adaptação ao claro, foram realizados os seguintes estímulos: 3.0 e 10.0 cd.s/m². Por fim, foi realizada a estimulação flicker com intensidade de 3.0 cd/m², nas frequências de 12,18, 24 e 30 Hertz (Hz), seguindo o protocolo da ISCEV.

Para os estímulos escotópicos, o valor logarítmico das amplitudes médias da onda b foi tabulado e relacionado ao valor logarítmico da intensidade luminosa de cada série de estímulos, e a curva resultante foi ajustado segundo a equação de Hill<sup>131</sup>:

$$V = V_{max} \frac{I^n}{k^n + I^n}$$

onde  $V_{\rm max}$  corresponde à amplitude saturada da onda b, I à intensidade luminosa, k é a intensidade luminosa necessária para se atingir 50% do valor de  $V_{\rm max}$ , e n é a inclinação da curva.

### 3.7. Injeções intravítreas

Seguido da realização do exame eletrorretinográfico, os coelhos ainda sedados e já dilatados foram submetidos a injeções intravítreas de TRI (40 mg/mL) nas doses de 8,0 mg (0,2 mL), 4,0 mg (0,1 mL) ou 1,0 mg (0,05 mL) no OD e solução salina balanceada com volume correspondente ao injetado no OD do mesmo animal, no OE. Os 12 coelhos utilizados somente para estudo

morfológico foram submetidos ao mesmo tipo de anestesia intramuscular, mas não realizaram exame eletrorretinográfico. Os 12 animais foram divididos em 3 grupos de 4 animais em cada grupo, e receberam doses intravítreas de TRI nas doses de 8, 4 ou 1 mg no seu olho direito e injeção de solução salina balanceada no OE no volume correspondente ao injetado em OD.

A técnica da injeção consistiu na assepsia do fórnice conjuntival através de aplicação de colírios de iodo polvidona a 5% e de ofloxacina a 0,3%, anestesia tópica com cloridrato de proximetacaína a 0,5%, colocação de blefarostato, paracentese de alívio na câmara anterior, removendo-se de 0.1 a 0,2 ml de humor aquoso, dependendo do volume a ser injetado, e injeção da droga no OD ou da solução salina balanceada no OE no quadrante temporal superior a 2,0 mm do limbo, orientando a agulha para o centro da cavidade vítrea. Foi utilizada agulha 30 gauge, acoplada a seringa de 1,0 mL. Após a aplicação, foi novamente realizado mapeamento de retina, checando-se a perfusão da artéria retiniana. Os coelhos foram observados durante a recuperação anestésica, e mantidos pelos próximos 30 dias (grupo ERG e morfologia, 30 animais) ou 7 dias (grupo somente morfologia, 12 animais) em gaiolas isoladas com alimentação e hidratação livres. Ao final deste período, os animais foram novamente submetidos à anestesia intramuscular descrita acima. Os animais submetidos a estudo eletrorretinográfico e imunoistoquímico foram mantidos em cativeiro por 30 dias, sendo realizado ERG após este período. Os

animais submetidos apenas a estudo imunoistoquímico foram mantidos em cativeiro por 7 dias. Todos os coelhos foram novamente sedados no dia do sacrifício.

## 3.8. Morfologia e imunoistoquímica

Após a realização do ERG (no grupo 30 dias) e antes do final dos efeitos da anestesia, os coelhos foram sacrificados através de injeção intracardíaca de 10 mg/ Kg de pentobarbital sódico. Em seguida, foi realizada a enucleação dos globos oculares, que foram fixados em uma solução de paraformaldeído a 4%, durante meia hora. O fixador, paraformaldeído a 4% (Sigma), foi preparado poucas horas antes, em tampão fosfato (PB) 0,1 molar (M), com pH de 7,4. Após o período de 30 minutos, o segmento anterior dos globos foi cuidadosamente dissecado através de incisão circular límbica, removendo-se córnea, íris e cristalino. O segmento posterior foi então pós-fixado no mesmo fixador descrito acima por 3,5 horas a 4°C. Em seguida, os olhos foram crioprotegidos através de passagens em concentrações crescentes de sacarose (10, 20 e 30%) em tampão fosfato 0,1 M. Para realização dos cortes histológicos congelados, os globos foram emblocados no composto Tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Torrence, Califórnia, EUA) e mantidos a 70°C negativos até serem cortados em criostato. Os globos foram cortados obtendo-se cortes longitudinais de 12 µm de

espessura, coletando-se amostras do tecido orientadas no sentido nasal-temporal da seguinte maneira: os 80 cortes iniciais de 30 µm foram desprezados, coletou-se o primeiro corte com 12 µm de espessura em 20 lâminas, desprezou-se mais 20 cortes de 30 µm, o segundo corte de 12 µm foi coletado em todas as lâminas, foram desprezados mais 50 cortes de 30 µm de espessura, e o último corte de 12 µm foi coletado, de modo que todas as 20 lâminas coletadas apresentavam amostras de diferentes porções do globo. As lâminas foram mantidas a -20°C até serem utilizadas.

Os cortes obtidos tanto do OD (injetado com a medicação) como do OE (controle, injetado com solução salina balanceada) foram corados utilizando-se H&E para análises histopatológicas.

A presença de apoptose foi pesquisada pelo ensaio TUNEL, de acordo com as instruções do fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Mannhelm, Alemanha). As lâminas foram lavadas em PB 0,05M, com pH de 7,4 e os cortes foram incubados em uma solução permeabilizante contendo Triton X-100 0,1 %, citrato de sódio 0,1% em PB 0,05 M por 2 minutos em gelo. Os cortes foram então incubados durante 1 hora com a enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) e os nucleotídeos marcados com fluoresceína foram incorporados aos terminais da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) fragmentada. A reação foi interrompida com uma solução contendo Tris-HCI 4 mM e EDTA 5 mM por 5 minutos. Após lavagens com PB 0,05M, as lâminas foram montadas

com VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, EUA) e observadas sob microscópio de fluorescência. Para o controle negativo, foi omitida a incubação com a enzima TdT.

O ensaio Fluoro-Jade B (Chemicon International, Temecula, Califórnia, EUA) foi utilizado para a identificação de necrose celular. Para este ensaio, as lâminas foram selecionadas e secas em chapa aquecida a 37°C durante 1 hora. Em seguida, as lâminas foram imersas em etanol absoluto por 3 minutos, seguido de etanol a 70° por 1 minuto e água deionizada por 1 minuto. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em solução a 0,06% de permanganato de potássio por 15 minutos sob agitação constante. Após lavagem de 1 minuto em água deionizada, as lâminas foram incubadas em solução de 0,001% de Fluoro-Jade B em água deionizada com 0,1% de ácido acético por 30 minutos sob agitação constante, no escuro. Em seguida, as lâminas sofreram 3 lavagens de 10 minutos em água deionizada e foram banhadas por 2 vezes em xilol, por 1 minuto, sendo cobertas pelo meio de montagem DPX (Electron Microscopy Science; Fort Washington, Filadélfia, EUA) e lamínula.

Por fim, foi realizada a imunoistoquímica para identificação da presença de expressão de GFAP. Os cortes foram lavados 3 vezes em tampão fosfato 0,1M por 10 minutos e incubados por aproximadamente 16 horas em

temperatura ambiente com o anticorpo primário contra GFAP (1: 1000, Sigma Anti-Protein Kinase Cα antibody produced in rabbit - P4334).

Após 3 novas lavagens em PB 0,1 M por 10 minutos para retirar o excesso de anticorpo primário, o material foi incubado com o anticorpo secundário Alexa 488 (1:500, Molecular Probes). Tanto o anticorpo primário quanto o secundário foram diluídos em solução de PB 0,1 M contendo 0,3% de Triton X-100. Os núcleos foram marcados com iodeto de propídeo 1:1000 (1 mg/mL). Posteriormente, as lâminas foram montadas com VectaShield e lamínula e analisadas em microscópio de fluorescência.

#### 3.9. Análise estatística

Cultura de células: Os dados foram submetidos a análise estatística utilizando-se os testes ANOVA (Prism, versão 3.0; GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e teste t de Student não pareado (bicaudal; GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). O teste de comparação múltipla de Newman-Keuls foi realizado para a comparação de dados em diferentes experimentos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de erro alfa (p) inferiores a 0,05. As barras de erro nos gráficos de viabilidade celular representam o erro padrão dos experimentos realizados em duplicatas e

repetidos por três vezes. As barras de erro nos gráficos de atividade da caspase-3/7 e JC-1 representam o erro padrão dos experimentos realizados em triplicatas e repetidos por três vezes.

## 3.10. Eletrorretinografia

O teste de postos com sinais de Wilcoxon foi utilizado para a comparação de amostras relacionadas. Amplitudes e tempos implícitos tanto da onda a como da onda b foram comparados nas amostras estudadas. No caso dos estímulos flicker, foi realizada análise de Fourrier utilizando-se 100 Hz como a frequência de corte. A análise dos harmônicos foi realizada através de análise de Fourrier utilizando-se o programa Matlab Signal Processing Toolbox (The Mathworks, Boston, Massachussets, EUA).

O primeiro harmônico foi comparado entre o OD (tratado com a droga) e OE (injetado com solução salina balanceada). Foram considerados estatisticamente significativos valores de p inferiores a 0,05.

Os parâmetros da curva de Hill correspondentes ao valor logarítmico da onda b escotópica versus o valor logarítmico da intensidade luminosa foram analisados através do teste estatístico ANOVA e teste t de Student bicaudal pareado com correção de Bonferroni para o número de comparações entre os grupos.

4. Resultados

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Viabilidade Celular nas Culturas Tratadas com TRIc

Células ARPE-19: A incubação com TRIc causou significativa diminuição da VC em todas as concentrações testadas (Gráfico 1). A viabilidade média das amostras de células da linhagem ARPE-19 após 24 horas de exposição ao TRIc foi de:  $13.0 \pm 6.5\%$ ,  $28.9 \pm 9.3\%$  e  $54.9 \pm 5.6\%$  para 1000, 500 ou  $200 \, \mu g/mL$ , respectivamente (p<0,001) e  $82.5 \pm 0.6\%$  para  $100 \, \mu g/mL$  (p<0,05) quando comparado a controles não tratados (97,0 ± 0,2%).

Células R28: As células expostas ao TRIc apresentaram uma diminuição significativa da VC quando comparadas a células controle não tratadas (22,7  $\pm$  2,4%, 34,6  $\pm$  1,9%, 58,7  $\pm$  1,4% e 75,3  $\pm$  2,5% para 1000, 500, 200 ou 100  $\mu$ g/mL, respectivamente versus 86,1  $\pm$  3,5% para controles não tratados, p<0,001, Gráfico 2).

Gráfico 1- Porcentagem de viabilidade celular de células ARPE-19 expostas ao Triesence® em cristais (TRIc)

## **TRIC ARPE-19**

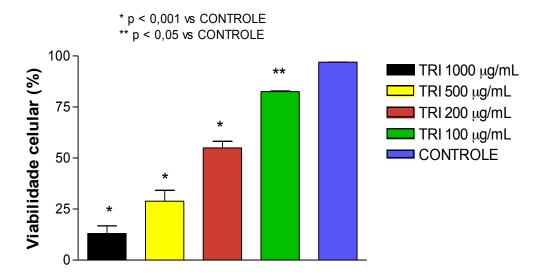
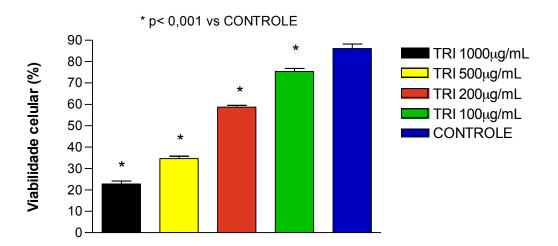


Gráfico 2- Porcentagem de viabilidade celular de células R28 expostas ao Triesence® em cristais (TRIc)

## TRIC R28



### 4.2. Viabilidade Celular nas Culturas Tratadas com TRIs

Células ARPE-19: A exposição ao TRIs não causou redução significativa na VC em nenhuma concentração testada. A viabilidade média das células ARPE-19 após 24 horas de exposição ao TRis foi de:  $78.6 \pm 27.1\%$ ,  $89.6 \pm 9.3\%$  e  $95.6 \pm 0.6\%$  para 1000, 500 e 200 µg/mL respectivamente, versus  $98.3 \pm 0.4\%$ ,  $97.7 \pm 0.7$  ou  $97.1 \pm 1.7$  para células tratadas com DMSO em doses equivalentes e  $97.0 \pm 0.2$  para controles não tratados (Gráfico 3).

Células R28: Resultados similares foram obtidos quando a VC das células R28 expostas ao TRIs foi comparada à das células expostas a DMSO em doses equivalentes ou quando comparado a controles não tratados (Gráfico 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre células expostas ao TRIs (71,9  $\pm$  16,8%, 78,6  $\pm$  16,1% ou 84,9  $\pm$  4,1% para 1000, 500 ou 200  $\mu$ g/mL respectivamente) e células expostas a doses equivalentes de DMSO (85,4  $\pm$  3,6%, 88,7  $\pm$  3,7% ou 92,0  $\pm$  2,3% para doses de DMSO equivalentes às utilizadas para solubilizar a droga nas concentrações de 1000, 500 ou 200  $\mu$ g/mL respectivamente) ou controles não tratados (92,6  $\pm$  0,9%).

### Resultados

Gráfico 3- Porcentagem de viabilidade celular de células ARPE-19 expostas ao Triesence® solubilizado em DMSO (TRIs)

### **TRIS ARPE-19**

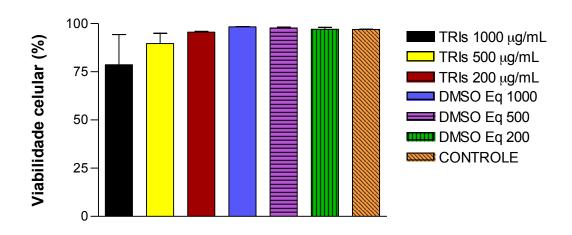
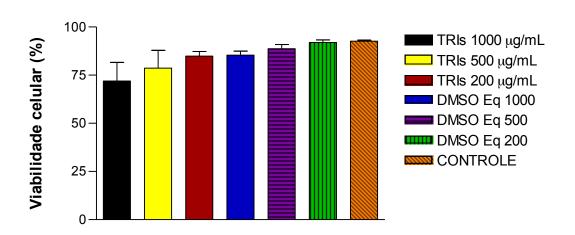


Gráfico 4- Porcentagem de viabilidade celular de células R28 expostas ao Triesence® solubilizado em DMSO (TRIs)

# TRIs R28



#### Resultados

## 4.3. Atividade da caspase- 3/7 em culturas tratadas com TRIs

Células ARPE-19: As células expostas a TRIs por 24 horas na concentração de 1000, 500 ou 200  $\mu$ g/mL apresentaram uma atividade de caspase-3/7 significativamente maior que os respectivos controles tratados com DMSO (16432,4 ± 596,3 msi versus 11862,1 ± 557,5, p<0,001; 16299,9 ± 205,2 msi versus 11836,2 ± 114,2 msi, p<0,001; e 13002,6 ± 152,8 msi versus 10709,1 ± 326,7 msi, p<0,01 para 1000, 500 e 200  $\mu$ g/mL, respectivamente). A atividade da caspase-3/7 em células tratadas com TRIs foi significativamente maior quando comparada a controles não tratados (10345,70 ± 171,82 msi). No entanto, as células tratadas com DMSO nas doses equivalentes a 1000 e 500  $\mu$ g/mL apresentaram uma maior atividade da caspase quando comparadas a controles não tratados (p<0,05 e p<0,01, respectivamente, Gráfico 5).

Células R28: As células tratadas por 24 horas com TRIs nas concentrações de 1000, 500 e 200  $\mu$ g/mL apresentaram aumento significativo da atividade da caspase-3/7 quando comparado aos controles tratados com DMSO (14958,3 ± 779,8 msi vs. 1713,0 ± 1632,0 msi, p<0,01; 14541,4 ± 3337,2 msi vs. 3465,5 ± 2445,9 msi, p<0,01; 14322,3 ± 2756,0 msi vs. 6997,1 ±

## Resultados

56,6 msi, p<0,05 para 1000, 500 e 200  $\mu$ g/mL, respectivamente). No entanto, apenas a dose mais elevada apresentou aumento significativo quando comparado a controles não-tratados (8298,5  $\pm$  900,8 msi, p<0,001). Os controles incubados com DMSO não foram estatisticamente diferentes dos controles não-tratados (Gráfico 6).

Gráfico 5- Atividade da Caspase 3/7 em células ARPE-19 expostas ao TRIs

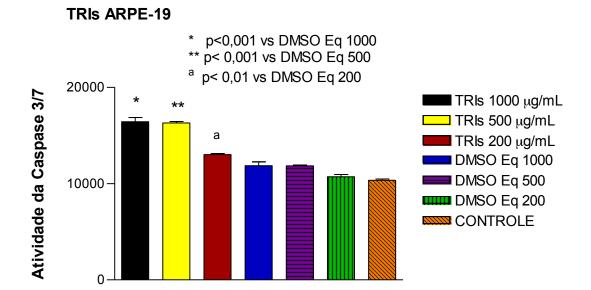
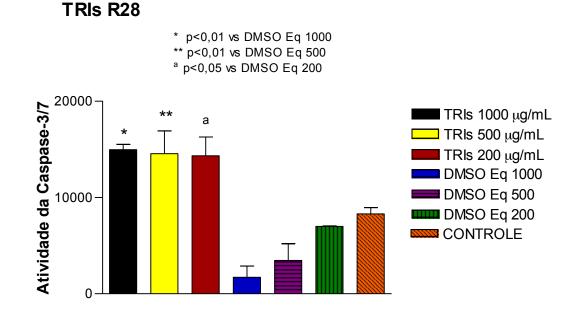


Gráfico 6- Atividade da Caspase 3/7 em células R28 expostas ao TRIs



# 4.4. Potencial de membrana mitocondrial nas culturas de células tratadas com TRIs

Células ARPE-19: Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas com TRIs  $(2,0\pm0,1,\,2,0\pm0,3$  ou  $2,3\pm0,6$  para 1000, 500 e 200 µg/mL, respectivamente), células tratadas com doses equivalentes de DMSO  $(2,4\pm0,4,\,2,6\pm0,4$  ou  $2,3\pm0,7$  para doses equivalentes a 1000, 500 ou 200 µg/mL) ou controles não tratados  $(1,6\pm0,3)$  com relação ao  $\Delta\Psi$ m (Gráfico 7).

Células R28: Resultados similares foram observados quando as células R28 foram expostas ao TRIs por 24 horas. Não houve diferença estatística no  $\Delta\Psi m$  entre células expostas ao TRIs  $(0.9\pm0.0,0.8\pm0.0)$  ou  $0.8\pm0.1$  para 1000, 500 ou 200  $\mu g/mL$ ), controles tratados com as quantidades equivalentes de DMSO  $(0.9\pm0.3,0.9\pm0.3$  e  $0.9\pm0.2$ , respectivamente para 1000, 500 ou 200  $\mu g/mL$ ), ou quando comparado a controles não tratados  $(0.7\pm0.3)$  (Gráfico 8).

Gráfico 7- Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) em cultura de células ARPE-19 tratadas com TRIs

#### **TRIS ARPE-19**

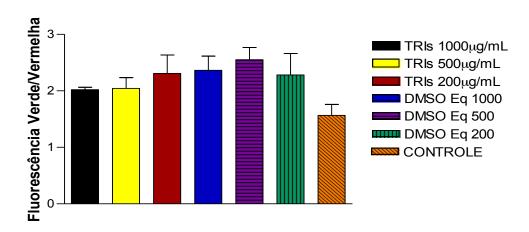
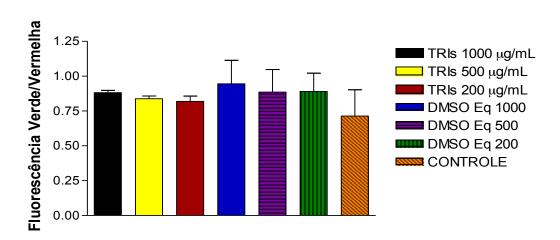


Gráfico 8- Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta \Psi m$ ) em cultura de células R28 tratadas com TRIs

## TRIs R28



#### 4.5. Eletrorretinografia

Para os estímulos fotópicos e escotópicos, foram analisados a amplitude e tempo implícito das ondas a e b.

Estímulos escotópicos: Os animais foram testados após adaptação de 30 minutos ao escuro. Obteve-se valores similares da amplitude da onda a e tempos implícitos para todos os estímulos realizados. Com relação à amplitude da onda b, não foi atingida significância estatística em qualquer intensidade de estímulo para as concêntrações de 1 ou 4mg, conforme demonstrado nos gráficos VLog (gráficos 9 e 10). A amplitude da onda b foi significativamente menor no olho direito do grupo que recebeu 8 mg da droga para o estímulo de 0,001 cd.s/m² (p=0.015, Gráfico 11). Entretanto, tal significância deixa de existir após a correção de Bonferroni-Holm.

Gráfico 9: Análise da amplitude da onda b para cada intensidade de estímulo escotópico estudado no grupo recebendo 1 mg de Triesence®

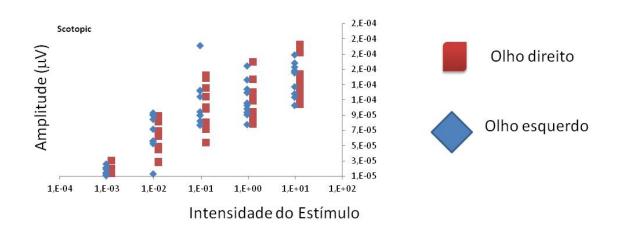


Gráfico 10: Análise da amplitude da onda b para cada intensidade de estímulo escotópico estudado no grupo recebendo 4 mg de Triesence®

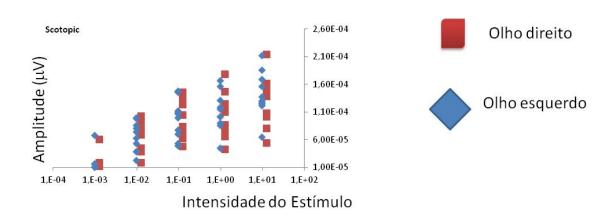
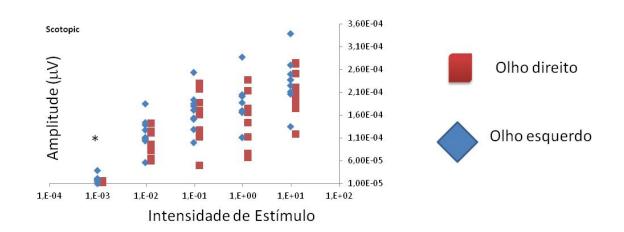


Gráfico 11: Análise da amplitude da onda b para cada intensidade de estímulo escotópico estudado no grupo recebendo 8 mg de Triesence®



Ainda com relação aos estímulos escotópicos, o valor logarítmico da onda b foi relacionado ao valor logarítmico da intensidade luminosa para cada quantidade de droga utilizada, e as curvas resultantes são apresentadas na figura 1. As curvas obtidas após 30 dias da aplicação intravítrea de TRI foram comparadas às curvas basais. Os parâmetros V<sub>max</sub>, k, e n são apresentados nas tabelas 1 a 3. Os parâmetros k e n não apresentaram alterações estatisticamente significativas após 30 dias em qualquer quantidade de TRI utilizada. Entretanto, o V<sub>max</sub> apresentou uma redução estatisticamente significativa após 30 dias no grupo recebendo 8mg da droga, mesmo após a correção de Bonferroni-Holm (p=0,01).

Figura 1: Curvas relacionando o valor logarítmico da onda b e o valor logarítmico do estímulo luminoso em condições escotópicas para animais recebendo 1, 4 ou 8mg de TRI.

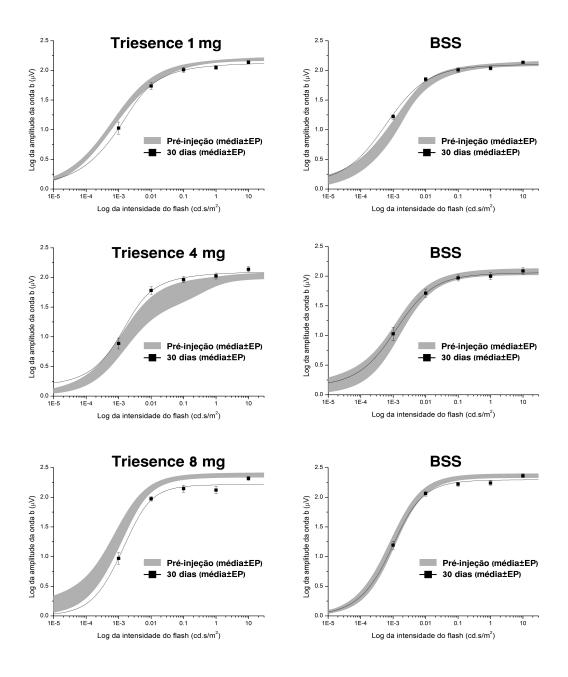


Tabela 1: Valores de  $V_{\text{max}}$  antes (basal) e após a aplicação da medicação

TRI					
1 mg		4 mg		8 mg	
Vmax		Vmax		Vmax	
Basal	30 dias	Basal	30 dias	Basal	30 dias
2,07325	2,09518	2,36495	2,28094	2.56712	2.31619
2,50064	2,22683	1,99899	2,10135	2.31618	2.10533
2,22329	2,07600	2,24165	2,16031	2.41142	2.17033
2,10784	1,99308	2,24974	2,19260	2.29174	2.18434
2,27155	2,13520	1,98480	2,38104	2.36871	2.38779
2,16464	2,24542	1,82992	2,13595	2.49338	2.20473
2,11881	2,03399	2,10213	1,86063	2.50631	2.10533
2,18061	2,03173	1,89077	1,98872	2.42976	2.40364
2,16975	1,98864	1,94221	1,71297	2.18486	2.27517
2,24112	2,59237	2,18385	1,93641	2.20768	1.98788
2,20515	2,14184	2,07890	2,07509	2.37772	2.21407
0,1	0,2	0,2	0,2	0.127801203	0.132485687

BSS					
1 mg		4 mg		8 mg	
Vmax		Vmax		Vmax	
Basal	30 dias	Basal	30 dias	Basal	30 dias
2,09518	2,25852	2,41644	2,26711	2,50023	2,28233
2,22683	2,07042	1,81524	2,25331	2,23543	2,32607
2,07600	2,21828	1,98904	2,10371	2,25245	2,09587
1,99308	2,03433	2,06296	2,23062	2,28330	2,28931
2,13520	2,01804	2,05519	5,19645	2,34670	2,35063
2,24542	2,19049	1,87807	2,05313	2,42797	2,34522
2,03399	2,14569	2,04136	1,96362	2,53921	2,16992
2,03173	2,11240	2,18811	2,13876	2,45466	2,49003
1,98864	2,12347	1,93647	1,73623	2,3635	2,32607
2,59237	1,97412	2,02924	2,08758	2,24197	2,26376
2,14184	2,11458	2,04121	2,40305	2,36454	2,29392
0,2	0,1	0,2	1,0	0.1	0.1

OD recebendo TRI; OE recebendo BSS. Em destaque amarelo: média  $\pm$  erro padrão.

Tabela 2: Valores de K antes (basal) e após a aplicação da medicação

TRI					
1 mg		4 mg		8 mg	
k		k		k	
Basal	30 days	Basal	30 dias	Basal	30 dias
0,00552	0,00231	0,00463	0,00764	0,00006	0,00103
0,00240	0,00779	0,00218	0,00193	0,00804	0,00784
0,00504	0,00555	0,00407	0,00101	0,00470	0,00127
0,00649	0,00117	0,00007	0,00651	0,00602	0,00974
0,00671	0,00203	0,00109	0,00004	0,00778	0,00939
0,00685	0,00581	0,00129	0,00870	0,00578	0,00339
0,00483	0,00691	0,00127	0,00136	0,00642	0,00784
0,00105	0,00188	0,00142	0,00178	0,00107	0,00123
0,00565	0,00113	0,00185	0,00254	0,00112	0,00195
0,00728	0,00450	0,00124	0,00141	0,00241	0,00124
0,00518	0,00391	0,00191	0,00329	0,00434	0,00449
0,002	0,002	0,001	0,003	0,003	0.004

BSS					
1 mg		4 mg		8 mg	
k		k		k	
Basal	30 dias	Basal	30 dias	Basal	30 dias
0,00231	0,00007	0,00548	0,00807	0,00764	0,00993
0,00779	0,00483	0,00396	0,00336	0,00814	0,00835
0,00555	0,00665	0,00150	0,00109	0,00951	0,00105
0,00117	0,00793	0,00422	0,00785	0,00741	0,00663
0,00203	0,00682	0,00123	0,00000	0,00112	0,00772
0,00581	0,00812	0,00734	0,00966	0,00954	0,00146
0,00691	0,00522	0,00171	0,00254	0,00435	0,00613
0,00188	0,00967	0,00225	0,00208	0,00979	0,00458
0,00113	0,00368	0,00163	0,00110	0,00688	0,00835
0,00450	0,00549	0,00124	0,00176	0,00153	0,00137
0,00391	0,00585	0,00306	0,00375	0,00659	0,00556
0,002	0,003	0.002	0,003	0.003	0.003

OD recebendo TRI; OE recebendo BSS. Em destaque amarelo: média  $\pm$  erro padrão.

Tabela 3: Valores de *n* antes (basal) e após a aplicação da medicação

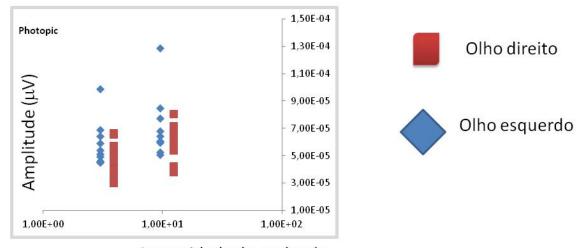
TRI					
1 mg		4 mg		8 mg	
n		n		n	
Basal	30 dias	Basal	30 dias	Basal	30 dias
0,68641	1,76973	0,60001	0,74234	0,30421	0,95340
0,30425	0,70240	0,93203	0,70032	0,79782	1,08932
0,66002	0,69922	0,57183	0,53929	0,57935	0,71087
0,56264	0,69669	0,29889	0,77163	1,12582	0,64460
0,53929	0,85496	0,96697	0,13529	0,91391	0,93652
0,69195	0,62843	0,76690	0,87431	0,86595	1,75855
0,62757	0,75935	0,79041	0,88224	0,79988	1,08932
0,56323	0,49071	1,15437	0,78691	0,98481	0,90428
0,67416	0,72760	0,86860	0,83413	0,9098	1,16288
0,71286	0,20423	0,91877	0,85078	1,51055	1,06622
0,60224	0,75333	0,78688	0,71172	0,87921	1,03160
0,1	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3

BSS					
1 mg		4 mg		8 mg	
n		n		n	
Basal	30 dias	Basal	30 dias	Basal	30 dias
1,76973	0,17085	0,55688	0,76381	0,84138	1,02953
0,70240	0,79853	0,97433	0,45124	0,74509	0,79080
0,69922	0,81100	0,51107	0,78544	0,70919	0,70547
0,69669	0,65876	1,01000	0,82493	1,05476	0,70263
0,85496	0,68619	0,92161	0,02292	0,94570	0,73150
0,62843	0,66642	0,98684	1,10536	0,10923	1,24467
0,75935	0,77450	0,79106	1,43649	0,61672	0,91685
0,49071	0,59791	0,29989	1,41132	0,81419	0,72663
0,72760	0,71447	0,94058	1,09056	0,82225	0,79080
0,20423	0,61858	0,93557	0,49714	1,25333	1,43293
0,75333	0,64972	0,79278	0,83892	0,79118	0,90718
0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3

OD recebendo TRI; OE recebendo BSS. Em destaque amarelo: média  $\pm$  erro padrão.

Estímulos fotópicos: Foram observados valores da onda a e tempos implícitos mais reduzidos no OD no grupo que recebeu 8 mg de TRI, porém não se atingiu significância estatística para estas variáveis. Para o grupo que recebeu 1 mg da medicação intravítrea, foi obtido em um dos animais um valor de amplitude 30% mais elevado que dos 9 animais restantes após estimulação com 10 cd.s/m², de modo que a orientação estatística foi desconsiderar este animal. Desta forma, não se obteve diferença estatística em relação à amplitude da onda b no grupo recebendo 1 mg da droga em nenhuma das duas intensidades testadas (gráfico 12). A amplitude da onda b foi significativamente reduzida no olho direito para ambas as intensidades testadas (3 e 10 cd.s/m²) nos grupos que receberam 4 ou 8 mg de medicação intravítrea (p=0,022 e p=0,028 para 4 mg; p=0,028 e p=0,038 para 8 mg) (Gráficos 13 e 14). Entretanto, após a correção de Bonferroni-Holm, apenas o grupo recebendo 4 mg da medicação manteve significância estatística.

Gráfico 12: Gráfico Vlog: Análise da amplitude da onda b para cada intensidade de estímulo fotópico estudado no grupo recebendo 1 mg de Triesence®.



Intensidade do estímulo

Gráfico 13: Gráfico Vlog: Análise da amplitude da onda b para cada intensidade de estímulo fotópico estudado no grupo recebendo 4 mg de Triesence®. \*:p<0,05

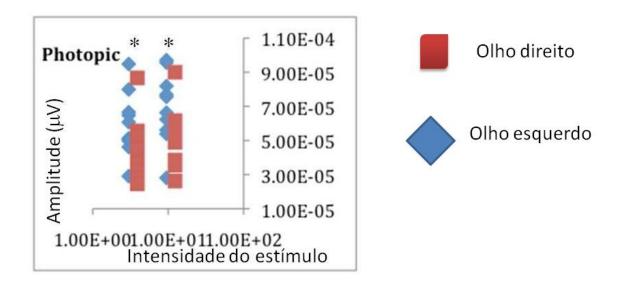
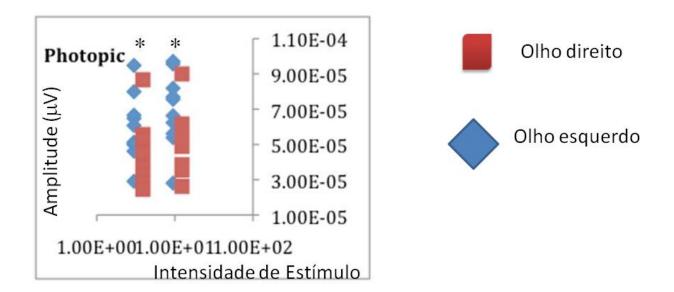


Gráfico 14: Gráfico Vlog: Análise da amplitude da onda b para cada intensidade de estímulo fotópico estudado no grupo recebendo 8 mg de Triesence®. \*:p<0,05



Estímulos flicker: Os traçados foram submetidos a análise de Fourrier utilizando-se 100 Hz como freqüência de corte. Decidiu-se por comparar o primeiro harmônico quanto à amplitude, entre o olho tratado (OD) e o olho controle (OE). Em todas as freqüências analisadas, a amplitude da onda obtida no OD foi reduzida em relação ao OE, mas obteve-se significância estatística somente para as freqüências de 24 ou 30 Hz para o grupo tratado com 8 mg de TRI (p=0,038 e p=0,028, respectivamente) e na freqüência de 30 Hz para o grupo tratado com 4 mg (p=0,007). Após correção de Bonferroni-Holm, manteve significância estatística apenas o grupo tratado com 4 mg de TRI, na frequência de 30 Hz. Não foi observada diferença estatisticamente significante na amplitude da onda no grupo tratado com 1 mg (gráficos 15 a 17).

Gráfico 15: Análise de Fourrier de diversas frequências de estimulação no grupo recebendo 1 mg de Triesence®.

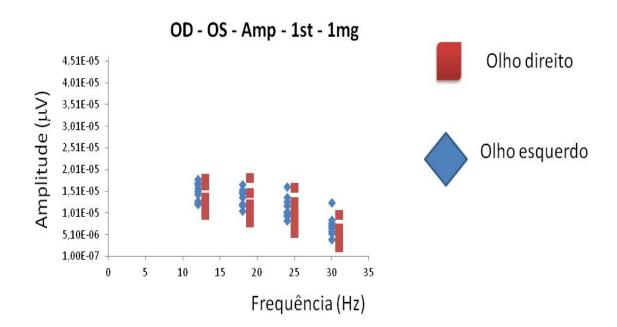


Gráfico 16: Análise de Fourrier de diversas frequências de estimulação no grupo recebendo 4 mg de Triesence®. \*: p<0,05

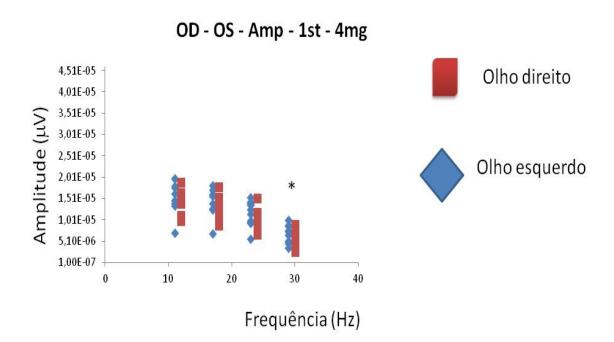
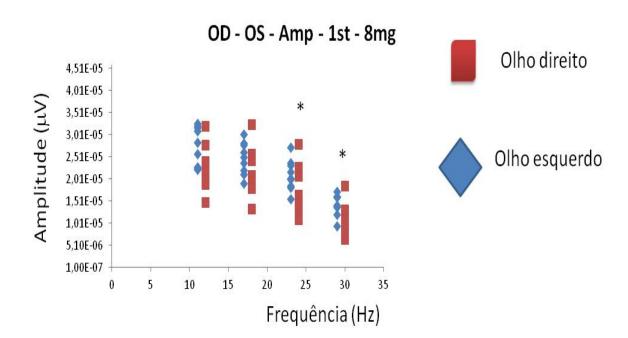


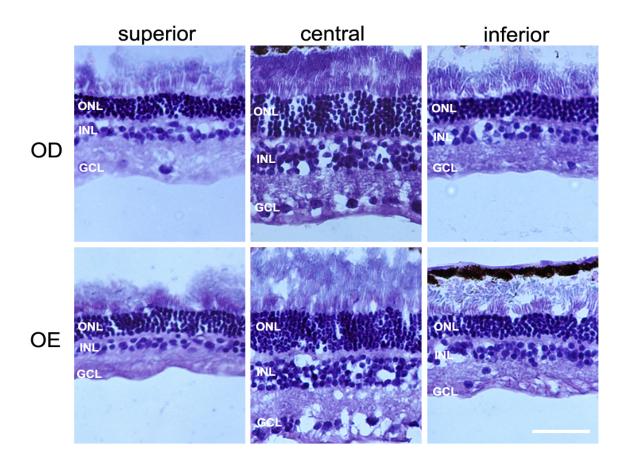
Gráfico 17: Análise de Fourrier de diversas frequências de estimulação no grupo recebendo 8 mg de Triesence®. \*: p<0,05.



## 4.6. Morfologia

A análise das lâminas coradas pela coloração H&E não demonstrou alterações morfológicas em nenhuma das concentrações testadas ou tempos estudados (figura 2).

Figura 2: Comparação entre a morfologia retiniana de OD, com 8 mg de TRI e OE, tratado com BSS, após 30 dias da aplicação.

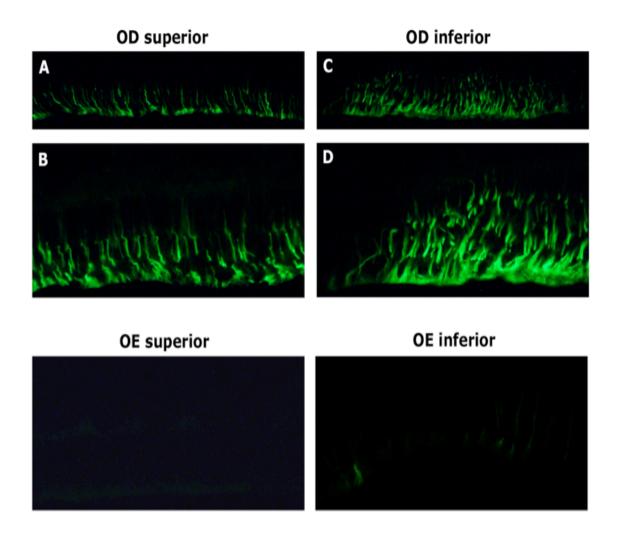


ONL: camada nuclear externa; INL: camada nuclear interna; GCL: camada de células ganglionares. Barra de escala (canto inferior direito da figura) correspondendo a 50  $\mu$ m, aumento de 40X.

O ensaio Fluorojade B não foi positivo para nenhuma concentração testada em nenhum tempo pesquisado. Da mesma forma, o ensaio Tunel não apresentou positividade em nenhuma das concentrações testadas (1, 4 ou 8 mg intravítreo) tanto após 7 dias como após 30 dias, sugerindo não haver evidências de necrose ou apoptose nos cortes estudados.

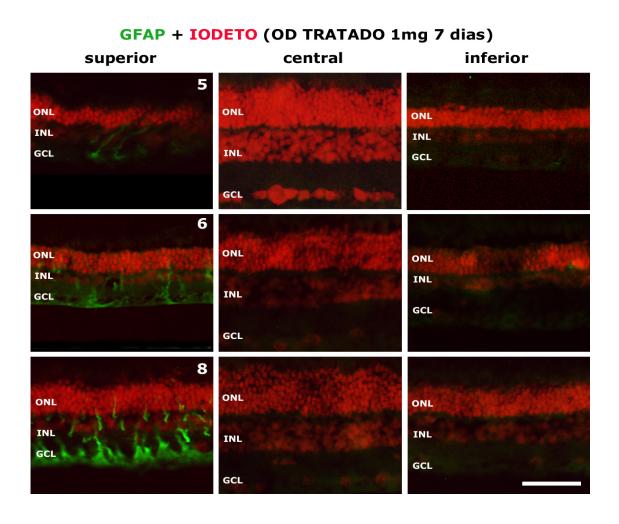
A marcação para GFAP foi negativa para todas as concentrações testadas tanto para olhos tratados como para controles após 30 dias, mas apresentou marcação evidente nos grupos sacrificados após 7 dias da injeção intravítrea, somente no olho que recebeu a medicação, em todas as concentrações testadas (figura 3). Observou-se uma marcação preferencial superior (próximo ao sítio da aplicação) para os grupos que receberam 1 ou 4 mg da droga, enquanto no grupo que recebeu 8 mg de TRI, observou-se marcação tanto na retina superior como na inferior (figuras 4 a 7).

Figura 3: Comparação entre OD e OE para a marcação imunoistoquímica com GFAP, após 7 dias de aplicação de Triesence®



A: Retina superior de OD, aumento de 20X; B: Retina superior de OD, aumento de 40X; C: Retina inferior de OD, aumento de 20X; D: Retina inferior de OD, aumento de 40X.

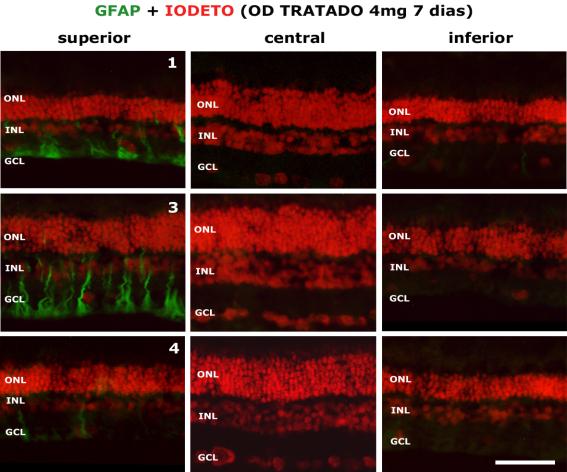
Figura 4: Marcação para GFAP em OD em diferentes regiões retinianas para três animais aleatórios no grupo recebendo 1 mg de Triesence® após 7 dias de aplicação



Barra de escala (canto inferior direito da figura) correspondendo a 50 µm

ONL: Camada nuclear externa; INL: camada nuclear interna; GCL: camada de células ganglionares. 5, 6 e 8: Fotografias representativas de três animais diferentes

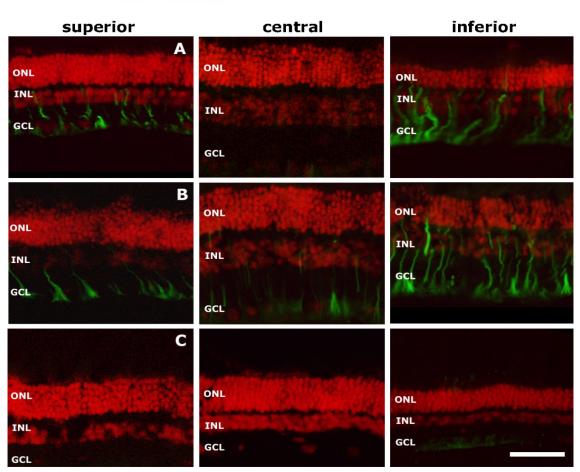
Figura 5: Marcação para GFAP em OD em diferentes regiões retinianas para três animais aleatórios no grupo recebendo 4 mg de Triesence® após 7 dias de aplicação



Barra de escala (canto inferior direito da figura) correspondendo a 50 µm

ONL: Camada nuclear externa; INL: camada nuclear interna; GCL: camada de células ganglionares. 1, 3 e 4: Fotografias representativas de três animais diferentes

Figura 6: Marcação para GFAP em OD em diferentes regiões retinianas para três animais aleatórios no grupo recebendo 8 mg de Triesence® após 7 dias de aplicação

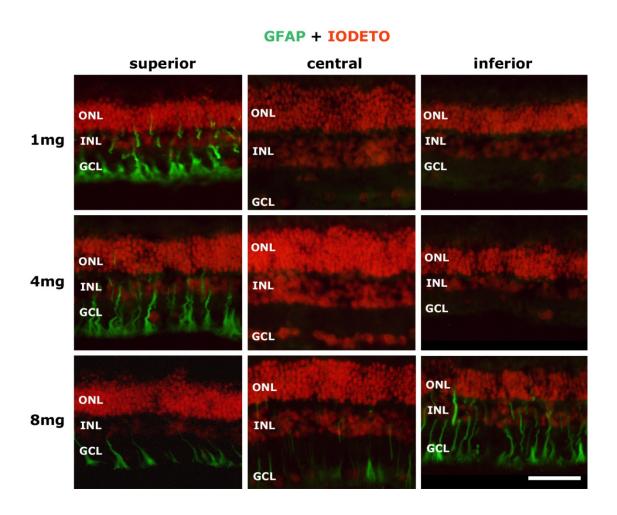


**GFAP + IODETO** (OD TRATADO 8mg 7 dias)

Barra de escala (canto inferior direito da figura) correspondendo a 50 µm.

ONL: Camada nuclear externa; INL: camada nuclear interna; GCL: camada de células ganglionares. A, B e C: Fotografias representativas de três animais diferentes

Figura 7: Quadro comparativo de diferentes regiões retinianas de animais submetidos a injeção intravítrea de Triesence® nas doses de 1, 4 ou 8 mg, com a marcação para GFAP, após 7 dias de aplicação



Barra de escala (canto inferior direito da figura) correspondendo a 50 µm

ONL: Camada nuclear externa; INL: camada nuclear interna; GCL: camada de células ganglionares

5. Discussão

### 5.DISCUSSÃO

Os experimentos realizados *in vitro* demonstraram uma diminuição da VC concentração dependente quando as células retinianas foram expostas por 24 horas ao TRIc. Não houve redução estatisticamente significativa após a droga ser solubilizada; entretanto, mesmo a exposição ao TRIs causou um aumento da expressão da caspase-3/7, indicativo de apoptose em ambos os tipos celulares testados. Os estudos eletrorretinográficos demonstraram uma redução significativa do V<sub>max</sub> escotópico na dose de 8 mg, enquanto que os estímulos fotópicos demonstraram queda significativa da amplitude da onda b para as concentrações de 4 e 8 mg. A análise de Fourrier para os estímulos flicker evidenciou queda da amplitude do primeiro harmônico, significativa na frequência de 30 Hz para a dose de 4 mg, e nas frequências de 24 e 30 Hz, para a dose de 8 mg. Quanto aos estudos histológicos e imunoistoquímicos, observou-se expressão transitória da GFAP nos olhos tratados com TRI.

Culturas celulares oferecem a vantagem de se manipular precisamente o meio, fornecendo um bom modelo experimental. Diversos autores já testaram a exposição do AT a células retinianas *in vitro*. Enquanto que para se testar a sensibilidade de células retinianas a esteróides, a cultura primária de células de rato já tenha sido utilizadada<sup>96</sup>, a maioria dos artigos publicados lida com cultura de células imortalizadas, pela maior facilidade no manuseio e na obtenção do número desejado de células. <sup>93,94,97,110,132,133</sup> Em nosso estudo, optamos por testar duas diferentes linhagens imortalizadas de

células retinianas- células do epitélio pigmentado da retinina humano (ARPE-19, obtidas diretamente do ATCC- Manassas, Virgínia, EUA) e células de retina primordial de ratos (R28), que se diferenciaria nos tecidos presentes na retina neurossensorial destes animais. Estas linhagens apresentam características morfológicas e funcionais similares às células *in vitro*, sendo portanto instrumento de grande valia no estudo da toxicologia ocular.<sup>132</sup>

A toxicidade do AT *in vitro* já é reconhecida em estudos prévios publicados em literatura. Yeung (2003), utilizando células ARPE-19 e fibroblastos, encontraram queda da VC e aumento da regulação de caspases, indicativo de apoptose. <sup>94</sup> Neste estudo, a incubação de células apenas com o veículo do AT não apresentou toxicidade. Já Chang (2007), utilizando-se também de células ARPE-19, encontraram toxicidade do AT após exposição de 2 horas de duração. <sup>97</sup> Não houve toxicidade significativa quando o veículo foi removido e a droga foi ressuspensa em solução salina balanceada.

Shaikih (2006) testou o Kenalog e outra formulação de triancinolona sem preservativo, incubando células da linhagem ARPE-19 por 5 dias, e notou redução da VC em ambas as formulações testadas. Narayanan (2006), com métodos semelhantes envolvendo as linhagens ARPE-19 e R28, testou a viabilidade celular e a atividade da desidrogenase mitocondrial após 2, 6 e 24 horas de exposição ao AT (Kenalog®). Doses a partir de 200 µg/mL de AT com ou sem seu veículo original causaram diminuição da VC e aumento da atividade da desidrogenase mitocondrial. As linhagens celulares incubadas somente com o veículo não apresentaram redução

significativa da viabilidade.<sup>93</sup> Oh (2007), testando formulação de AT com preservativo em cultura de células de EPR, observou que 0,01 mg/mL de AT causava redução da viabilidade celular após 30 minutos, enquanto concentrações maiores apresentavam toxicidade em menos tempo.<sup>133</sup>

Apesar de todos os trabalhos demonstrarem toxicidade *in vitro*, o mecanismo proposto para explicar os achados é diverso. Enquanto alguns autores consideram o preservativo AB o causador da toxicidade, trabalhos em que formulações sem preservativo foram utilizadas também demonstram queda da VC,<sup>132</sup> de modo que outras teorias devem ser propostas para explicar a redução da viabilidade de células retinianas à exposição *in vitro* do AT, sendo que o preservativo AB possa ser um fator complementar no mecanismo da toxicidade.

soluções Os preservativos de oftalmológicas apresentam funções antimicrobianas, de manutenção de potência, e de prolongar a meia vida de medicações por retardar sua biodegradabilidade. O AB não é utilizado como preservativo em soluções oftalmológicas de uso tópico por ser irritante e apresentar atividade lenta<sup>134</sup>, mas encontra-se presente na formulação de AT conhecida como Kenalog®, inicialmente desenvolvida para uso intramuscular ou intra-articular. Algumas medicações utilizam o AB como preservativo e solvente; quando injetado no organismo, é geralmente oxidado em ácido benzóico e conjugado com glicina no fígado, para posteriormente ser excretado. No passado, a utilização endovenosa de soluções salinas preservadas com AB a 0,9% em recém nascidos prematuros causou

complicações como a síndrome fetal tóxica, hemorragias intraventriculares, comprometimento neurológico, e até 16 mortes neonatais, devido à função de metabolismo ainda imatura do fígado neonatal, levando ao acúmulo e toxicidade prolongada do AB. 135-7

Algumas publicações consideram que o AB não é tóxico para as células da retina<sup>93,94</sup>, mas a grande maioria dos estudos demonstra lesão celular retiniana quando existe exposição ao AB. Chang (2007) encontrou necrose após exposição *in vitro* de células retinianas a este agente<sup>97</sup>; Morrison (2006) demonstrou que doses 3,3 vezes maiores que as injetadas em olhos humanos causaram palidez retiniana e hemorragias intrarretinianas em olhos de coelhos, que posteriormente evoluíram com atrofia documentada histologicamente.<sup>138</sup> Além disto, altas concentrações de AB causam diminuição da amplitude da onda b em análises eletrorretinográficas.<sup>139</sup> Este somatório de evidências levou muitos autores a recomendarem a remoção do veículo de formulações de AT com preservativo antes da aplicação intraocular, e impulsionou o desenvolvimento e difusão de formulações sem preservativo.<sup>138</sup>

Em nosso estudo, utilizamos o TRI, uma formulação de AT aprovada nos EUA para evidenciar membranas vítreas durante cirurgias e para tratamento de condições inflamatórias. Esta formulação não contém o preservativo AB e apresenta cerca de 2,5 vezes menos polisorbato quando comparado ao Kenalog®. Nossos resultados em cultura de células são similares à literatura, demonstrando uma redução dose dependente da VC após exposição das células retinianas a 24 horas da droga, o que

demonstra que mesmo uma formulação sem o preservativo AB é tóxica para células retinianas *in vitro*. Tais achados foram recentemente confirmados por Spitzer (2011), que notou citotoxicidade in vitro após 24 horas da exposição de TRI a culturas de células ganglionares de ratos e a células da linhagem ARPE-19, em doses variando de 0,1 a 1,0 mg/mL. Neste mesmo trabalho, resultados similares foram encontrados após a exposição das mesmas linhagens celulares ao Kenalog®. 140

Solubilizamos os Triesence® em DMSO para determinar o papel dos cristais de AT (encontrados na solução disponível comercialmente) sobre as células retinianas. Para se obter o TRIs, a droga foi centrifugada, o sobrenadante contendo o veículo foi removido, e a mesma quantidade de DMSO foi adicionada a fim de se diluir a droga. Estudos prévios em literatura demonstram que a concentração final atingida pelo método da centrifugação é idêntico à concentração comercial original da droga. Por outro lado, a técnica de sedimentação reduz a concentração esperada em 25% e a técnica da filtração diminui a concentração original em 45 a 75%, a depender do diâmetro dos poros. 41

Em ambas as linhagens testadas, observamos um aumento de VC após a solubilização da droga, o que sugere que a ausência de cristais na preparação solubilizada se correlaciona com maiores porcentagens de VC, quando comparado a culturas de células expostas a concentrações idênticas da droga, com a diferença única de terem cristais em contato direto com as células.

De acordo com nossos achados, os efeitos mecânicos dos cristais em contato com as células retinianas das linhagens testadas estão provavelmente relacionados à citotoxicidade observada. As partículas de AT podem variar em tamanho de 2 a 80 µm, dependendo da técnica de purificação e da formulação testada.<sup>28</sup> A fim de tentar diferenciar o efeito mecânico do efeito químico das partículas de AT, Szurman (2006)<sup>127</sup> expôs células ganglionares a partículas de AT ou pérolas de vidro com tamanho aproximado igual às partículas de AT, e demonstrou citotoxicidade rápida e significativa para AT, mas não para as partículas de vidro. Este dado sugere que o efeito mecânico de partículas epicelulares deva ser insignificante, mas não consegue descartar que o formato dos cristais de AT possam estar envolvidos na morte celular. 110 Entretanto. evidências indicam que o AT não é tóxico a menos que haja direto contato dos cristais com a superfície celular. 110,127 Os cristais de AT parecem exercer uma forte toxicidade química concentração dependente caso ocorra adesão à superfície apical celular. 30 Se a concentração de AT se encontra abaixo do equilíbrio de solubilidade desta droga, que é de 36 µg/mL. 142,143 nenhuma toxicidade é documentada, mas com o aparecimento de pequenas quantidades de cristais aderidos à membrana celular, é notada toxicidade rápida e progressiva. Alguns autores sugerem que os cristais epirretinianos ajam através de um efeito tóxico químico localizado, ao invés de um efeito puramente mecânico. 30,110,127

Os dados acima corroboram os achados do presente estudo, uma vez que diferentes métodos suportam a participação dos cristais de AT na toxicidade observada *in vitro*. Em nosso estudo, a exposição das células retinianas à droga em sua forma de

cristais (TRIc) gerou perda da VC dose dependente, e a solubilização da medicação (TRIs) reduziu este efeito para níveis estatisticamente não significativos, demonstrando o papel dos cristais de AT na fisiopatologia da redução da VC.

Apesar da VC não estar diminuída significativamente após a exposição ao TRIs, poderiam haver alterações celulares mais sutis indicativas de toxicidade. Por este motivo, foram pesquisadas as mudanças no ΔΨm, assim como na atividade da caspase 3/7 em culturas expostas ao TRIs. Em ambas as linhagens celulares, não houve mudança significativa no ΔΨm, mas houve aumento dos níveis de caspase 3/7 nas concentrações de 1000 μg/mL, 500μg/mL e 200μg/mL, sugerindo apoptose celular após 24 horas de exposição à droga in vitro, mesmo esta sendo solubilizada. Trabalhos prévios já demonstraram que a exposição de células retinianas ao AT (Kenalog®) leva a um aumento da atividade da caspase 3/7.94,96,97 A apoptose apresentada mesmo com os cristais solubilizados pode ser explicada por ao menos duas teorias. Pode-se considerar que quando grandes concentrações da droga solubilizada são colocadas em contato com as células retinianas por período prolongado, o AT acaba por se precipitar e entra em contato com as células, e o contato direto dos cristais seria o responsável pelos efeitos tóxicos observados. Outra explicação plausível é que a solubilização em DMSO alteraria o equilíbrio de solubilidade (geralmente em 36 µg/mL), aumentando a concentração de droga solubilizada em contato com as membranas celulares, conforme proposto e publicado por nosso grupo em 2011. 144

Nossos resultados indicam aumento dos níveis de caspase quando as células ARPE-19 foram tratadas com DMSO em doses equivalentes a 1000 ou 500µg/mL, mas não quando a linhagem R28 foi exposta às mesmas concentrações do solvente, o que encontra-se em concordância com estudos prévios em ratos, que demonstraram uma redução da função retiniana dose-dependente para concentrações de DMSO acima de 1,77X10<sup>-4</sup>mM, sendo específica para determinadas camadas da retina.<sup>145</sup>

Em nossos experimentos, constatamos que a exposição ao TRIs induziu um aumento significativo na expressão de caspase-3/7, indicativo de apoptose caspasedependente. As mitocondrias apresentam papel chave na regulação da apoptose pois estão envolvidas na produção de radicais livres de oxigênio na cascata oxidativa, e são muito susceptíveis a danos oxidativos através da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, e mutações no DNA mitocondrial. Em outras palavras, esta organela é fundamental na geração de radicais livres de oxigênio, mas também é o principal alvo do stress oxidativo. A liberação subsequente do citocromo c para o citolpasma e a abertura de poros transmembrana mitocondrial são passos críticos na cascata apoptótica. As vias de morte celular programada são classificadas de acordo com o envolvimento (caspase-dependente) ou exclusão (caspase- independente) da ativação das enzimas caspase. A ativação dos iniciadores caspase-8 ou -9 estimula a ativação do efetor caspase-3, que induz a clivagem da ADP-ribose polimerase, degradação proteolítica de vários alvos celulares, e ativação de endonucleases, culminando com a morte celular. 98 Nossos resultados demonstram que a exposição de células retinianas

ao AT gera diminuição da VC apoptose dependente, confirmando dados prévios de literatura. 93,94,96,134

Em nosso estudo, a exposição das células R28 ou ARPE-19 por 24 horas ao TRI não resultou em alteração significativa no  $\Delta\Psi$ m, mas ocasionou aumento significativo dos níveis de caspase-3/7 em concentrações a partir de 200 ug/mL. O  $\Delta\Psi$ m mede a integridade da membrana mitocondrial através de um corante catiônico que se acumula dentro de organelas sadias, que tenham seu potencial elétrico de membrana preservado, resultando em uma fluorescência vermelha. O corante não penetra em mitocôndrias com potenciais transmembrana baixos, resultando em fluorescência verde. Deste modo, o  $\Delta\Psi$ m é considerado um marcador precoce de instabilidade mitocondrial, mesmo em células expostas a baixos níveis de oxidantes, incapazes de desencadear apoptose.  $^{147,148}$ 

No entanto, a elevação dos níveis de caspase-3/7 sem alteração significativa do  $\Delta\Psi$ m já foi descrita previamente em trabalho in vivo envolvendo a exposição de células retinianas ao ácido micofenólico, um derivado do micofenolato de mofetila utilizado para imunossupressão sistêmica. Além disto, a exposição de células retinianas ao corante indocianina verde gera uma diminuição da porcentagem de VC sem haverem mudanças significativas no  $\Delta\Psi$ m. Teorias plausíveis para o aumento na atividade de caspases sem mudança no  $\Delta$ Cm, são propostas a seguir: 1) linhagens celulares em multiplicação constante, como as utilizadas no presente estudo, apresentam uma porcentagem significativa de mitocôndrias ainda imaturas; 2) nem todas as

mitocôndrias numa mesma célula apresentam o mesmo potencial de membrana. $^{152}$  3) o  $\Delta\Psi m$  pode não ser uniforme na mesma mitocôndria, como demonstrado em mitocôndrias de tamanho extenso encontradas em fibroblastos. $^{152}$ 

Com relação aos experimentos eletrofisiológicos e morfológicos realizados neste estudo, optou-se pela utilização de coelhos pigmentados como modelo experimental *invivo*. Nossa escolha se baseou no fato de que a maior parte dos estudos de toxicidade retiniana de várias drogas foi realizada em coelhos. 25,112,153-6 Além disto, as doses intravítreas utilizadas atualmente, assim como de antibióticos para o tratamento de endoftalmite, foram estabelecidas com base nos resultados de estudos experimentais em coelhos. Anatomicamente, os olhos de coelhos têm tamanho e volume relativamente próximos aos dos olhos humanos e, portanto, permitem a realização dos exames de oftalmoscopia e de ERG com relativa facilidade. A histologia da retina dos coelhos também é muito próxima à do olho humano. Com relação ao manejo dos animais, os coelhos são animais de fácil manipulação e podem ser anestesiados com segurança para a realização de exames e procedimentos de curta duração, como os realizados neste projeto.

A preferência por coelhos pigmentados em nosso estudo se deve a achados prévios de que a melanina se liga a inúmeros fármacos e pode influenciar a meia vida de drogas *in vivo*. Hughes (1996) comparou a eliminação vítrea de ganciclovir e aciclovir em coelhos pigmentados e albinos. A pigmentação ocular apresentou efeitos dramáticos na farmacocinética vítrea, uma vez que a taxa de eliminação da droga foi

muito mais lenta em coelhos pigmentados.<sup>158</sup> Diferenças na pigmentação ocular também alteram a penetração de drogas via transescleral para a retina de ratos. Os níveis de droga mensurados no complexo EPR-coróide declinam de maneira mais lenta quando comparado a olhos albinos, possivelmente pela ligação da melanina a certos compostos.<sup>159</sup>

Quando considerados estudos eletrorretinográficos prévios envolvendo a aplicação do AT em modelos experimentais in vivo, os dados disponíveis na literatura são controversos. Alguns autores encontraram redução da amplitude das ondas a e b, e associaram a toxicidade encontrada ao preservativo AB utilizado em algumas formulações. Zeghiu (2009) utilizou 40 olhos de coelhos chinchila, divididos em 4 grupos, que receberam respectivamente BSS, AT com preservativo, AT sem preservativo ou somente o preservativo presente no AT utilizado. Os animais foram acompanhados por até 90 dias, e somente os que receberam o preservativo com ou sem AT apresentaram redução da amplitude fotópica e escotópica. A queda da amplitude foi transitória, e se normalizou após 90 dias de acompanhamento. 104 Kai (2006) utilizou 40 olhos de coelhos albinos (New Zeland) para testar o efeito da aplicação de AT com e sem preservativo quando comparado a BSS, e encontrou declínio significativo da amplitude do ERG nos grupos recebendo o preservativo, após seguimento de até 2 meses. 105 Similarmente, Macky (2007) demonstrou uma redução da amplitude das ondas do ERG utilizando coelhos pigmentados recebendo solução salina balanceada ou AB. Animais recebendo injeções intravítreas do sobrenadante da

solução de AT, contendo o AB, apresentaram redução significativa do ERG por até 6 semanas. Vale ressaltar que o AB foi obtido de soluções comerciais de Kenalog® submetidas a sedimentação e que, como exposto anteriormente, este processo não é o ideal para se livrar de todos os cristais de AT no sobrenadante.

Outros trabalhos relacionados à exposição de AT às células retinianas consideram não haver evidência de toxicidade do ponto de vista eletrorretinográfico. Dierks (2005) avaliou três grupos com seis coelhos albinos em cada grupo, e não notou alterações eletrorretinográficas entre os animais que receberam AT com preservativo, o próprio preservativo ou AT ressuspendido em solução salina balanceada. Kim (2006), também utilizando um modelo experimental de coelhos albinos com acompanhamento por quatro meses, não notou alterações no ERG após injeções de AT sem preservativo nas doses de 4 ou 16 mg. Albini (2007) injetou 4 mg intravítreo de Kenalog® em um olho e solução salina balanceada no olho contralateral de dez coelhos pigmentados, realizando ERG após duas (dez animais) ou doze semanas (seis animais) e não notou diferenças na amplitude das ondas a e b entre os olhos tratados e controles. Li (2012) não encontrou redução da amplitude das ondas a e b após injeção de Kenalog® em olhos de porcos da Índia.

Finalmente, similarmente aos nossos achados, alguns autores apontam redução da amplitude do ERG após injeção intravítrea de AT, sinalizando toxicidade retiniana. Luke (2008), utilizando modelo experimental de retina bovina superperfundida exposta ao AT sem preservativo, observou redução significativa da onda b concentração

dependente a partir de 4 mg/mL, reversível até 20 mg/mL, mas irreversíveis para a dose de 40 mg/mL.<sup>30</sup> Lang (2007) seguiu 43 olhos de coelhos albinos por quatro semanas, dividindo-os em três grupos: os que receberam Kenalog®, seu veículo, ou AT sem preservativo. Enquanto a injeção de Kenalog® ou de seu preservativo reduziu a amplitude da onda b em até 50%, a injeção de AT sem preservativo reduziu a amplitude da onda b em cerca de 14%, demonstrando que o preservativo AB presente em muitas formulações está envolvido na toxicidade observada, mas não pode ser considerado o único responsável pelos achados.<sup>99</sup>

Não encontramos em nosso estudo diferenças significativas no tempo de latência ou na amplitude da onda a. Entretanto, nossos achados demonstram uma redução dose-dependente da amplitude da onda b após 30 dias da aplicação intravítrea de TRI, observados tanto na estimulação fotópica, como também pelo flicker, que apresentou nos olhos testados redução significativa na sua amplitude nas freqüências de 24 e 30 Hz para o grupo injetado com 8 mg, e de 30 Hz para os animais injetados com 4 mg, e na estimulação escotópica, através da redução do V<sub>max</sub> para o grupo recebendo 8 mg da droga.

Considera-se  $V_{max}$  como a amplitude máxima obtida no platô de uma função intensidade- resposta, e portanto indica o ganho de um sistema. O parâmetro k é a intensidade que produz metade da amplitude do  $V_{max}$ , e fornece uma medida de sensibilidade. A variável n indica a inclinação da curva, e geralmente se aproxima de

 $1.^{160,161}$  Por convenção, considera-se  $V_{max}$  a amplitude máxima da onda b, e o valor logarítmico de k, como indicativo da sensibilidade retiniana.  $^{161}$ 

Em nossos experimentos, a análise dos estímulos escotópicos revelou uma diminuição estatisticamente significativa do  $V_{\text{max}}$  no grupo recebendo a maior quantidade da droga (8 mg), enquanto que os parâmetros k e n não demonstraram alterações significativas. Dados em literatura atribuem a queda do V<sub>max</sub> a uma perda de fotorreceptores secundária a algum processo patológico. 162-6 Entretanto, evidências mais recentes obtidas através de simulações em modelos matemáticos sugerem que o V<sub>max</sub> pode estar diminuído por mudanças relativamente discretas na resposta máxima ou sensibilidade de bastonetes. A magnitude da redução do V<sub>max</sub> dependeria do número de fotorreceptores afetados e o grau em que são afetados quando comparado à região mais saudável da retina. 167 Uma queda de V<sub>max</sub> pode ocorrer bem antes que o fotorreceptor interrompa sua função. 167 Como diversos trabalhos não demonstram alterações morfológicas após a aplicação intravítrea de esteróides 97,100,103,104,106,107,111, acreditamos que os níveis elevados de TA possam alterar o funcionamento dos fotorreceptores sem contudo lesá-los permanentemente. Além da diminuição do valor de V<sub>max</sub>, tal hipótese explicaria a ativação transitória da GFAP observada em nosso estudo, que discutiremos adiante.

Atualmente, não existe um protocolo padrão para a estimulação tipo flicker em coelhos. Mesmo em se considerando que estes animais são utilizados em uma ampla gama de protocolos para se testar a ação retiniana de certas drogas 168-170, a maioria

dos testes em coelhos segue o protocolo de estimulo proposto para humanos pela ISCEV.<sup>109</sup> No entanto, sabemos haverem diferenças importantes no processamento do sinal dos cones entre diferentes espécies. Como exemplo, o sinal do flicker em roedores exibe baixa resolução espacial, <sup>171-3</sup> ao contrario de humanos e macacos. <sup>174-8</sup>

Em contrapartida a roedores e de maneira similar a humanos, o ERG de coelhos exibe uma resposta robusta à frequência de 30 Hz, 168-170 mas a resposta a frequências menores é bem mais reduzida quando comparado a roedores. 172,173 Em nossos experimentos, observamos justamente nas frequências testadas mais altas, que são as mais indicadas para este modelo experimental (24 e 30 Hz), uma queda da amplitude da onda flicker no olho que recebeu a medicação.

Evidências indicam que a estimulação tipo flicker representa primariamente a atividade elétrica das células bipolares associadas a cones<sup>179</sup>, mas existem diversas populações de células bipolares pertencentes a diferentes vias pós-sinápticas. Nossos resultados indicam uma redução da função da via de cones associada às concentrações intravítreas mais elevadas, provavelmente por dano a células da retina interna, visto não termos notado alteração na amplitude e latencia da onda a. O TRI deve portanto interferir com uma população de células da retina interna associadas à transmissão de cones, com características de sinalização de altas frequências.

Com relação à avaliação morfológica, como anteriormente comentado, a maioria dos artigos não demonstra haverem alterações após a aplicação de AT. 97,100,103,104,106,107,111 Entretanto, alguns autores notaram alterações estruturais após a aplicação intravítrea de AT: Kai (2006) notou edema da mitocôndrias dos

fotorreceptores após dois meses da aplicação de AT intravítreo, e atribuiu os achados ao veículo utilizado<sup>126</sup>; Lang (2007) notou afilamento retiniano e perda da organização normal após a aplicação intravítrea de Kenalog® ou de seu veículo, mas não observou estes achados quando o Kenalog® foi injetado sem seu veículo<sup>99</sup>; Yu (2006) notou que a medicação se precipita na cavidade vítrea inferior, e analisando morfologicamente esta porção da retina, descreveu para olhos injetados com 4, 8 ou 20 mg de AT, as seguintes alterações dose dependentes: a perda do segmento externo de fotorreceptores, desorganização da retina externa e a migração de células similares a macrófagos para o espaço subretiniano.<sup>112</sup> A injeção de AT no espaço subretiniano já foi testada e é tóxica, causando áreas de ausência ou de hiperpigmentação do ERP e lesão de fotorreceptores à microscopia óptica, e perda da interdigitação entre fotorreceptores e o EPR.<sup>180</sup>

Os resultados do presente estudo não demonstraram alterações morfológicas à microscopia óptica, ou alterações à imunoistoquímica com o ensaio de TUNEL (objetivando avaliar a presença de células em apoptose) ou fluorojade-B (pesquisando a presença de células em necrose). O ensaio avaliando o aumento da expressão da GFAP foi negativo após 30 dias, confirmando os achados de Ruiz Moreno (2007), <sup>101</sup> mas foi positivo quando os animais foram avaliados após 7 dias (Figuras 3 a 7).

Detectamos em nosso experimento um aumento transitório da expressão de GFAP, associado a qualquer dose testada da medicação, que não foi observado quando o mesmo volume de solução salina balanceada foi injetado na cavidade vítrea do olho contralateral, excluindo-se desta forma um aumento da PIO

como fator causal. O real significado da expressão transitória de GFAP após injeção intravítrea de TRI ainda não está elucidado e deve ser objeto de futuras pesquisas na área.

Nota-se tanto em cultura de células, como na análise do ERG e na análise morfológica de diferentes trabalhos publicados na literatura, uma ampla variedade de resultados, que pode ser explicado não somente por diferentes metodologias, mas também por diferentes formulações de AT utilizadas, uma vez que a farmacocinética e a farmacodinâmica de cada composto de AT é bastante diferente entre si e parece depender da distribuição do tamanho dos cristais de AT de cada formulação.<sup>28</sup>

Adicionalmente, observa-se uma dissociação entre os resultados *in vitro*, onde a maioria dos trabalhos demonstra clara toxicidade dos cristais de AT sobre as células retinianas, e os resultados *in vivo*, com alterações menos intensas e muitas vezes ausentes. Para tentar explicar esta dissociação, Szurmann (2007) utilizou cápsulas anteriores extraídas de pacientes submetidos a facoemulsificação, as utilizou como membrana basal sobre uma camada de células ganglionares em cultura, e observou que as áreas cobertas por membrana basal não apresentavam células mortas após exposição ao AT, e a interface entre células viáveis e mortas seguiu exatamente as bordas da cápsula anterior. De maneira similar, em áreas onde as células ganglionares estavam cobertas com vítreo porcino, não foram observadas células mortas.<sup>110</sup>

Além de um efeito protetor mecânico, propõe-se que a membrana limitante interna aja como um filtro, de modo que a concentração interna da droga que atinge o

EPR seja muito menor que a concentração vitrea. Considera-se ainda que a circulação da retina e da coriocapilar, presentes em humanos e em modelos experimentais *in vivo*, ajude a diminuir os níveis da droga no compartimento intraocular, por remover de maneira continuada a medicação que se difunde pelos tecidos intrarretinianos.<sup>101</sup>

As considerações acima apresentam relevância clínica em certas circunstâncias: olhos vitrectomizados, em especial os submetidos à remoção da membrana limitante interna, seriam em teoria mais susceptíveis a danos tóxicos pela injeção intravítrea de AT, pela falta de barreiras protetivas (tanto o humor vítreo como a membrana limitante interna), possibilitando o contato direto do cristal às células da retina interna. Somandose a este mecanismo, durante cirurgias vitreorretinianas, onde os cristais de AT são utilizados para evidenciar membranas e traves vítreas, caso ocorra migração inadvertida de cristais para o espaço subretiniano, podem haver alterações na camada de células do EPR e na retina externa, conforme já relatado. 180,181

Em nosso estudo, observamos que a exposição das células retinianas ao TRI causou uma redução da VC por apoptose, que parece estar relacionada ao contato direto de cristais às células. A injeção intravítrea da medicação em um modelo experimental de coelhos pigmentados causou uma diminuição da amplitude da onda b em estímulos fotópicos ou escotópicos, e uma diminuição da amplitude do flicker, sugerindo disfunção da retina interna na via dos cones. O estudo morfológico e

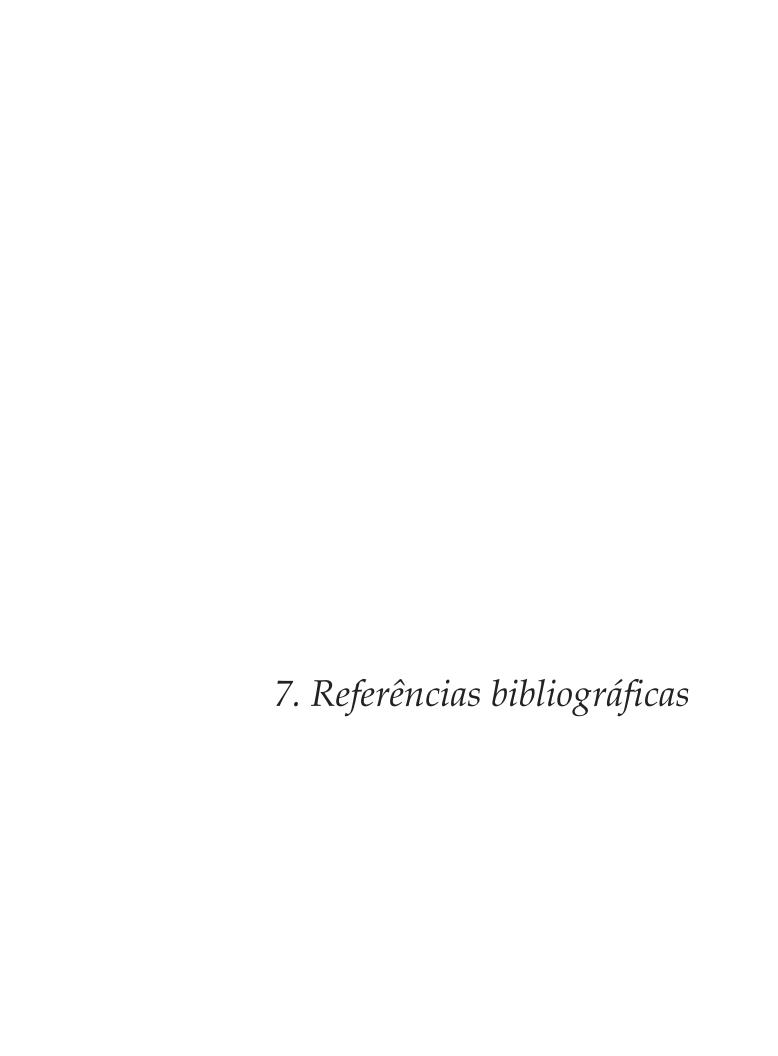
imunoistoquímico demonstrou ativação temporária da proteína GFAP, sugerindo stress ao menos transitório às células retinianas.

O presente estudo apresenta uma série de limitações: escolhemos como modelo experimental o coelho, cujo vítreo apresenta cerca de 1,4 mL, cerca de três vezes menos que um olho humano (4,5 mL). Desta forma, a concentração intravítrea é cerca de três vezes maior para determinada quantidade de droga injetada em coelhos quando comparado a humanos. Além disto, o humor vítreo de coelhos é mais denso que o de humanos idosos, sendo mais efetivos em manter a medicação como um depósito consolidado por mais tempo. Deve-se também considerar que respostas eletrorretinográficas e imunoistoquímicas podem diferir entre espécies, prejudicando a extrapolação dos dados para a prática clínica diária. A despeito destas limitações, consideramos que em situações particulares, tais como em olhos vitrectomizados com ou sem remoção da membrana limitante interna, ou quando inadvertidamente se realiza injeção subretiniana da medicação, o TRI possa ser tóxico para as células retinianas devido ao contato direto do cristal às células neuronais.

6. Conclusão

#### 6. CONCLUSÃO

- As células retinianas expostas ao Triesence® apresentam diminuição de viabilidade dose-dependente em ambas as linhagens celulares testadas (TRIc), que é minimizada com a solubilização da droga (TRIs);
- A toxicidade em cultura de células parece estar relacionada ao contato direto dos cristais de AT e ocorre por apoptose celular;
- --Mesmo após solubilizada (TRIs), a droga causa apoptose via ativação de caspases em ambas as culturas celulares testadas;
- -A injeção da droga em modelo experimental *in vivo* causa alteração do ERG fotópico e escotópico;
- Existe aumento da regulação transitório de GFAP pelas células de Müller após a aplicação intravítrea de Triesence®, indicando "stress" tecidual retiniano.



- 1. Lee HB, Pulido JS, McCannel CA, Buettner H. Role of inflammation in retinal vein occlusion. Can J Ophthalmol. 2007;42:131–3.
- Jonas JB, Kreissig I, Degenring RF. Intravitreal triamcinolone acetonide as treatment of macular edema in central retinal vein occlusion. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 2002;240:782–3.
- Sivaprasad S, McCluskey P, Lightman S. Intravitreal steroids in the management of macular oedema. Acta Ophthalmol Scand. 2006;84:722–33.
- Jonas JB, Kreissig I, Kamppeter B, Degenring RF. Intravitreal triancinolone acetonide for the treatment of intraocular edematous and neovascular diseases. Ophthalmologe. 2004;101:113–20.
- 5. Spaide RF. Rationale for combination therapies for choroidal neovascularization. Am J Ophthalmol. 2006;141:149–56.
- Spaide RF. Combination therapies for choroidal neovascularization. Em: Holz FG, Spaide RF, eds. Medical Retina (Essentials in Ophthalmology). Heidelberg, Alemanha: Springer; 2007:p. 90–104.
- 7. Rhen T, Cidlowski JA. Anti-inflammatory action of glucocorticoids: new mechanisms for old drugs. N Engl J Med. 2005;353:1711–23.
- Vinores SA, Xiao WH, Aslam S. Implication of the hypoxia response element of the VEGF promoter in mouse models of retinal and choroidal neovascularization, but not retinal vascular development. J Cell Physiol. 2006;206:749–58.
- Apte RS, Richter J, Herndon J, Ferguson TA. Macrophages inhibit choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. PLoS Med. 2006;3:1371–81.
- Kelly J, Khan AA, Yin J, Ferguson TA, Apte RS. Senescence regulates macrophage polarization and angiogenic fate at sites of tissue injury. J Clin Invest. 2007;117:3421–6.

- 11. Dace D, Khan AA, Kelly J, Apte RS. Interleukin-10 promotes pathologic developmental angiogenesis by regulating macrophage responsiveness to hypoxia. PLoS One. 2008;3:3381.
- Graham RO, Peyman GA. Intravitreal injection of dexamethasone.
   Treatment of experimentally induced endophthalmitis. Arch Ophthalmol. 1974;92(2):149–54.
- 13. Peyman GA, Rose M, Sanders D. Intravitreal antibiotic injection and vitrectomy in acute bacterial endophthalmitis. Can J Ophthalmol. 1976;11:188–90.
- 14. Peyman GA, Vastine DW, Meisels HI. The experimental and clinical use of intravitreal antibiotics to treat bacterial and fungal endophthalmitis. Doc Ophthalmol. 1975;39:183–201.
- 15. Peyman GA, Vastine DW, Diamond JG. Vitrectomy and intraocular gentamycin management of Herellea endophthalmitis after incomplete phacoemulsification. Am J Ophthalmol. 1975;80:764–5.
- 16. Machemer R, Sugita G, Tano Y. Treatment of intraocular proliferations with intravitreal steroids. Trans Am Ophthalmol Soc. 1979;77:171–80.
- 17. Tano Y, Sugita G, Abrams G, Machemer R. Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. Am J Ophthalmol. 1980;89:131–6.
- Tano Y, Chandler D, Machemer R. Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. Am J Ophthalmol. 1980;90:810–6.
- Ishibashi T, Miki K, Sorgente N, Patterson R, Ryan SJ. Effects of intravitreal administration of steroids on experimental subretinal neovascularization in the subhuman primate. Arch Ophthalmol. 1985;103:708–11.

- Penfold PL, Gyory JF, Hunyor AB, Billson FA. Exudative macular degeneration and intravitreal triamcinolone. A pilot study. Aust N Z J Ophthalmol. 1995;23:29–38.
- 21. Danis RP, Ciulla TA, Pratt LM, Anliker W. Intravitreal triamcinolone acetonide in exudative agerelated macular degeneration. Retina. 2000;20:244–50.
- 22. Hardman J, Limbird L, Goodman A. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Chicago, EUA: McGraw-Hill; 2001.
- 23. Inoue M, Takeda K, Morita K, Yamada M, Tanigawara Y, Oguchi Y.Vitreous concentrations of triamcinolone acetonide in human eyes after intravitreal or subtenon injection. Am J Ophthalmol. 2004;138:1046-8.
- 24. Driot JY, Novack GD, Rittenhouse KD, Milazzo C, Pearson PA. Ocular pharmacokinetics of fluocinolone acetonide after Retisert intravitreal implantation in rabbits over a 1-year period. J Ocul Pharmacol Ther. 2004;20:269-75.
- 25. Kwak HW, D'Amico DJ. Evaluation of the retinal toxicity and pharmacokinetics of dexamethasone after intravitreal injection. Arch Ophthalmol. 1992;110:259-66.
- 26. Jaffe GJ, Martin D, Callanan D, Pearson PA, Levy B, Comstock T; Fluocinolone Acetonide Uveitis Study Group. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis: thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study. Ophthalmology. 2006;113:1020-7.
- 27. Chang-Lin JE, Attar M, Acheampong AA, Robinson MR, Whitcup SM, Kuppermann BD, Welty D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained-release dexamethasone intravitreal implant. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52:80-6.

- 28. Zacharias LC, Lin T, Migon R, Ghosn C, Orilla W, Feldmann B, Ruiz G, Yong L, Burke J, Kuppermann BD. Assessment of the Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics between Four Distinct Formulations of Triamcinolone Acetonide. Retina 2013; 33: 522-31.
- 29. Edelman JL, Lutz D, Castro MR. Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown. Exp Eye Res. 2005;80:249-58.
- 30. Lüke M, Januschowski K, Beutel J, Warga M, Grisanti S, Peters S, Schneider T, Lüke C, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. The effect of triamcinolone crystals on retinal function in a model of isolated perfused vertebrate retina. Exp Eye Res. 2008; 87:22-29.
- 31. Devlin T. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. Nova Jersei, EUA, Wiley-Liss, 2005.
- 32. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. Am J Physiol 1992; 268:181-91.
- Naveh N, Weissman C. Prolonged corticosteroid treatment exerts transient inhibitory effect on prostaglandin E2 release from rabbits' eves. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1991;42:101-5.
- 34. Lewis GD, Campbell WB, Johnson AR. Inhibition of prostaglandin synthesis by glucocorticoids in human endothelial cells. Endocrinology. 1986;119:62-9.
- Heffernan JT, Futterman S, Kalina RE. Dexamethasone inhibition of experimental endothelial cell proliferation in retinal venules. Invest Ophthalmol Vis Sci 1978;17:565-8.

- 36. Bhattacherjee P, Williams RN, Eakins KE. A comparison of the ocular anti-inflammatory activity of steroidal and nonsteroidal compounds in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 1983;24:1143-6.
- 37. Antonetti DA, Wolpert EB, De Maio L, Harhaj NS, Scaduto RC Jr. Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. J Neurochem 2002;80:667–77.
- 38. Ando N, Sen HA, Berkowitz BA, Wilson CA, de Juan E Jr. Localization and quantification of blood-retinal barrier breakdown in experimental proliferative vitreoretinopathy. Arch Opthalmol 112:117–22, 1994.
- 39. Matsuda S, Gomi F, Oshima Y, Tohyama M, Tano Y. Vascular endothelial growth factor reduced and connective tissue growth factor induced by triamcinolone in ARPE19 cells under oxidative stress. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:1062–8, 2005.
- 40. Nauck M, Karakiulakis G, Perruchoud AP, Papakonstantinou E, Roth M. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. Eur J Pharmacol 341:309–15, 1998.
- 41. Sohn HJ, Han DH, Kim IT, Oh IK, Kim KH, Lee DY, Nam DH. Changes in aqueous concentrations of various cytokines after intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for diabetic macular edema. Am J Ophthalmol. 2011;152:686-94.
- 42. Penfold PL, Wen L, Madigan MC, Gillies MC, King NJ, Provis JM. Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of the ECV304 cell line: implications for macular degeneration. Clin Exp Immunol 121:458–465, 2000.

- 43. Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, Miyahara S, Katsuta H, Hirose F, Musashi K, Yoshimura N. Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:1440–4, 2005.
- 44. Miyamoto N, Iossifov D, Metge F, Behar-Cohen F. Early effects of intravitreal triamcinolone acetonide on macular edema. Mechanistic Implication. Ophthalmology 2006; 113: 2048-53.
- 45. Shah A, Branley M. Use of intravitreal triamcinolone in the management of birdshot retinochoroidopathy associated with cystoid macular oedema: a case study over a three-year period. Clin Experiment Ophthalmol. 2005;33:442-4.
- 46. Karacorlu M, Arf Karacorlu S, Ozdemir H. Intravitreal triamcinolone acetonide in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. Eur J Ophthalmol. 2006;16:481-3.
- 47. Pathengay A. Intravitreal triamcinolone acetonide in serpiginous choroidopathy. Indian J Ophthalmol. 2005;53:77-9.
- 48. Adigüzel U, Sari A, Ozmen C, Oz O. Intravitreal triamcinolone acetonide treatment for serpiginous choroiditis. Ocul Immunol Inflamm. 2006;14:375-8.
- 49. Ozdemir H, Karacorlu M, Karacorlu S. Intravitreal triamcinolone acetonide in sympathetic ophthalmia. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2005;243:734-6.
- 50. Karacorlu M, Ozdemir H, Karacorlu S. Intravitreal triamcinolone acetonide for the treatment of chronic pseudophakic cystoid macular oedema. Acta Ophthalmol Scand. 2003;81:648-52.
- 51. Ip M, Kahana A, Altaweel M. Treatment of central retinal vein occlusion with triamcinolone acetonide: an optical coherence tomography study. Semin Ophthalmol. 2003;18:67-73.

- 52. Ciardella AP, Klancnik J, Schiff W, Barile G, Langton K, Chang S. Intravitreal triamcinolone for the treatment of refractory diabetic macular oedema with hard exudates: an optical coherence tomography study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2004;242:1024-7.
- 53. Massin P, Audren F, Haouchine B, Erginay A, Bergmann JF, Benosman R, Caulin C, Gaudric A. Intravitreal triamcinolone acetonide for diabetic diffuse macular edema: preliminary results of a prospective controlled trial. Ophthalmology. 2004;111:218-24.
- 54. Bandello F, Polito A, Pognuz DR, Monaco P, Dimastrogiovanni A, Paissios J. Triamcinolone as adjunctive treatment to laser panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol. 2006;124:643-50.
- 55. Jonas JB, Kampeter B. Intravitreal triamcinolone acetonide for persisting cystoid macular edema after penetrating keratoplasty. Cornea. 2006;25:240-1.
- 56. Shields CL, Demirci H, Dai V, Marr BP, Mashayekhi A, Materin MA, Manquez ME, Shields JA. Intravitreal triamcinolone acetonide for radiation maculopathy after plaque radiotherapy for choroidal melanoma. Retina. 2005;25:868-74.
- 57. Shields CL, Demirci H, Marr BP, Mashayekhi A, Dai VV, Materin MA, Shields JA. Intravitreal triamcinolone acetonide for acute radiation papillopathy. Retina. 2006;26:537-44.
- 58. Li KK, Goh TY, Parsons H, Chan WM, Lam DS. Use of intravitreal triamcinolone acetonide injection in unilateral idiopathic juxtafoveal telangiectasis. Clin Experiment Ophthalmol. 2005;33:542-4.
- 59. Sirimaharaj M, Robinson MR, Zhu M, Csaky KG, Donovan B, Sutter F, Gillies MC. Intravitreal injection of triamcinolone acetonide for immune recovery uveitis. Retina. 2006;26:578-80.

- 60. Spaide RF, Sorenson J, Maranan L. Combined photodynamic therapy and intravitreal triamcinolone for nonsubfoveal choroidal neovascularization. Retina 2005; 25: 685-90.
- 61. Augustin AJ, Schmidt-Erfurth U. Verteporfirin therapy combined with intravitreal triamcinolone in all types of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. Ophthalmology 2006; 113:14-22.
- 62. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. A Randomized Trial Comparing Intravitreal Triamcinolone Acetonide and Focal/Grid Photocoagulation for Diabetic Macular Edema. Ophthalmology 2008;115:1447-59.
- 63. Elman MJ, Bressler NM, Qin H, Beck RW, Ferris FL 3rd, Friedman SM, Glassman AR, Scott IU, Stockdale CR, Sun JK; Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. Ophthalmology 2011;118:609–614.
- 64. The Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE)

  Study Report 6. A Randomized Trial Comparing the Efficacy and
  Safety of Intravitreal Triamcinolone With Standard of Care to Treat
  Vision Loss Associated with Macular Edema Secondary to Branch
  Retinal Vein Occlusion. Arch Ophthalmol 2009; 127; 1115-29.
- 65. The Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE) Study Report 5. A randomized trial comparing the efficacy and safety of intravitreal triamcinolone with observation to treat vision loss associated with macular edema secondary to central retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol 2009; 127: 1101-14.

- 66. Burk SE, da Mata AP, Snyder ME, Schneider S, Osher RH, Cionni RJ. Visualizing vitreous using Kenalog suspension. J Cataract Refract Surg. 2003; 29:645-51.
- 67. Yamakiri K, Ushino E, Kimura K, Sakamoto T. Intracameral triamcinolone helps to visualize and remove the vitreous body in anterior chamber in cataract surgery. Am J Ophthalmol. 2004; 138:650-2.
- 68. Peyman GA, Cheema R, Conway MD, Fang T. Triamcinolone acetonide as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloids during pars plana vitrectomy. Retina 2000; 20:554-5.
- 69. Sonoda KH, Sakamoto T, Enaida H, Miyazaki M, Nakamura T, Ueno A, Yokoyama M, Kubota T, Ishibashi T. Residual vitreous cortex after surgical posterior vitreous separation visualized by intravitreous triamcinolone acetonide. Ophthalmology 2004; 111:226-30.
- 70. Yamamoto N, Ozaki N, Murakami K. Triamcinolone acetonide facilitates removal of the epiretinal membrane and separation of the residual vitreous cortex in highly myopic eyes with retinal detachment due to a macular hole. Ophthalmologica 2004; 32:56-9.
- 71. Shah GK, Rosenblatt BJ, Smith M. Internal limiting membrane peeling using triamcinolone acetonide: histopathologic confirmation. Am J Ophthalmol. 2003; 138:656-7.
- 72. Song JH, Hong YT, Kwon OW. Acute syphilitic posterior placoid chorioretinitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008;246:1775-8.
- Kocabora MS, Durmaz S, Kandemir N. Exacerbation of central serous chorioretinopathy following intravitreal triamcinolone injection. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008;246:1783-6.

- 74. Kahook MY, Noecker RJ, Abdelghani WM, Schuman JS. Filtering bleb rupture after intravitreal triamcinolone acetonide injection. Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 2008;39:232-3.
- 75. Sarraf D, Vyas N, Jain A, Bui A, Kertes PJ, Freund KB, Chan C. Triamcinolone-associated crystalline maculopathy. Arch Ophthalmol. 2010;128:685-90.
- 76. Wingate RJ, Beaumont PE. Intravitreal triamcinolone and elevated intraocular pressure. Aust N Z J Ophthalmol. 1999;27:431-2.
- 77. Jonas JB, Kreissig I, Degenring R. Intraocular pressure after intravitreal injection of triamcinolone acetonide. Br J Ophthalmol. 2003;87:24-7.
- Bakri SJ, Beer PM. The effect of intravitreal triamcinolone acetonide on intraocular pressure. Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 2003;34:386-90.
- 79. Kaushik S, Gupta V, Gupta A, Dogra MR, Singh R. Intractable glaucoma following intravitreal triamcinolone in central retinal vein occlusion. Am J Ophthalmol. 2004;137:758-60.
- 80. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCR.net), Beck RW, Edwards AR, Aiello LP, Bressler NM, Ferris F, Glassman AR, Hartnett E, Ip MS, Kim JE, Kollman C. Three-year follow-up of a randomized trial comparing focal/grid photocoagulation and intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema. Arch Ophthalmol. 2009;127:245-51.
- 81. Moshfeghi DM, Kaiser PK, Scott IU, Sears JE, Benz M, Sinesterra JP, Kaiser RS, Bakri SJ, Maturi RK, Belmont J, Beer PM, Murray TG, Quiroz-Mercado H, Mieler WF. Acute endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection. Am J Ophthalmol. 2003;136:791-6.

- 82. Jonas J B, Kreissig I, Degenring R F. Endophthalmitis after intravitreal injection of triamcinolone acetonide. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 1663–69.
- 83. Gilles M C, Simpson J M, Billson F A, Luo W, Penfold P, Chua W, Mitchell P, Zhu M, Hunyor AB. Safety of intravitreal injection of triamcinolone: results from a clinical trial. *Arch Ophthalmol* 2004;122:336–40.
- 84. Jonas J B, Kreissig I, Degenring R F. Retinal complications of intravitreal injections of triamcinolone acetonide. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242:184–188.
- 85. Jonas JB, Kreissig I, Spandau UH, Harder B. Infectious and noninfectious endophthalmitis after intravitreal high-dosage triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 2006; 141: 579–580.
- 86. Nelson ML, Tennant MT, Sivaligan A, Regillo CD, Belmont JB, Martidis A. Infectious and presumed noninfectious endophthalmitis after intravitreal triamcinolone injection. *Retina* 2003; 23: 686–691.
- 87. Wang LC, Yang CM. Sterile endophthalmitis following intravitreal injection of triamcinolone acetonide. Ocul Immunol Inflamm. 2005;13:295-300.
- 88. Stepien KE, Eaton AM, Jaffe GJ, Davis JL, Raja J, Feuer W. Increased incidence of sterile endophthalmitis after intravitreal triamcinolone acetonide in spring 2006 Retina 2009;29:207-13.
- 89. Maia M, Farah ME, Belfort RN, Penha FM, Lima Filho AA, Aggio FB, Belfort R Jr. Effects of intravitreal triamcinolone acetonide injection with and without preservative. Br J Ophthalmol 2007; 91:1122-4.
- 90. Kenalog®. Informações da bula. Disponível no endereço eletrônico: <a href="http://www.onlinepharmacycatalog.com/drugs-medications/allergy-medications/triamcinolone/kenalog-injection-pi.pdf">http://www.onlinepharmacycatalog.com/drugs-medications/allergy-medications/triamcinolone/kenalog-injection-pi.pdf</a>. Acessado em 14/03/2013.

- 91. TRIESENCE®. Informações da bula. Disponível no endereço eletrônico: <a href="http://www.rxlist.com/triesence-drug.htm">http://www.rxlist.com/triesence-drug.htm</a>. Acessado em 14/03/2013.
- 92. Dyer D, Callanan D, Bochow T, Abraham P, Lambert HM, Lee SY, Schneiderman T, Potts SL, Walker TM. Clinical evaluation of the safety and efficacy of preservative-free triamcinolone (triesence [triamcinolone acetonide injectable suspension] 40 mg/mL) for visualization during pars plana vitrectomy. Retina 2009;29:38-45.
- 93. Narayanan R, Mungkal JK, Kenney MC, Seigel GM, Kuppermann BD. Toxicity of triamcinolone acetonide on retinal neurosensory and pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:722-8.
- 94. Yeung CK, Chan KP, Chiang SW, Pang CP, Lam DS. The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44:5293-300.
- 95. Yeung CK, Chan KP, Chan CK, Pang CP, Lam DS. Cytotoxicity of triamcinolone on cultured human retinal pigment epithelial cells: comparison with dexamethasone and hydrocortisone. Jpn J Ophthalmol. 2004; 48:236-42.
- 96. Chung H, Hwang JJ, Koh JY, Kim J, Yoon YH. Triamcinolone acetonide-mediated oxidative injury in retinal cell culture: comparison with dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:5742-9.
- 97. Chang YS, Wu CL, Tseng SH, Kuo PY, Tseng SY. Citotoxicity of triamcinolone acetonide on human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:2792-8.
- 98. Cellerino A, Bahr M, Isenmann S. Apoptosis in the developing visual system. Cell Tissue Res. 2000;301:53–69.

- 99. Lang Y, Zemel E, Miller B, Perlman I. Retinal toxicity of intravitreal Kenalog in albino rabbits. *Retina* 2007; 27: 778-88.
- 100. Dierks D, Lei B, Zhang K, Hainsworth DP. Electroretinographic effects of an intravitreal injection of triamcinolone in rabbit retina. *Arch Ophthalmol.* 2005; 123:1563-9.
- 101. Ruiz-Moreno J, Montero JA, Bayon A, Rueda J, Vidal M. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide at high doses in the rabbit. *Exp Eye Res.* 2007;84:342-8.
- 102. Macky T, Helmy D, Shazly NE. Retinal toxicity of triamcinolone's vehicle (benzyl alcohol): an electrophysiological and electron microscopic study. *Graefe's Clin Exp Ophthalmol*. 2007; 245:817-24.
- 103. Li Y, Chen H, Hou J, Zhang Y, Li G, Gu X, Luo L, Shen H, Qu J, Cheng L. Further characterization of ocular safety profile of commercially available preserved and preserved-free triamcinolone acetonide Retina 2012; 32: 364-74.
- 104. Zenghyu S, Fang W, Ying F. Vehicle used for triamcinolone is toxic to ocular tissues of the pigmented rabbit. Cur Eye Res 2009;34:769-76.
- 105. Kai W, Yanrong J, Xiaoxin Li, Vehicle of triamcinolone acetonide is associated with retinal toxicity and transient increase of lens density. Graefe's Arch Cin Exp Ophthalmol 2006;244:1152-9.
- 106. 135. Kim H, Csaky C, Gravlin L, Yuan P, Lutz R, Bungay P, Tansey G, de Monastério F, Potti GK, Grimes G, Robinson MR. Safety and pharmacokinetics of a preservative-free triamcinolone acetonide formulation for intravitreal administration. Retina 2006;26:523-30.

- 107. Albini TA, Abd-El-Barr MM, Carvounis PE, Iyer MN, Lakhanpal RR, Pennesi MM, Chevez-Barrios P, Wu SM, Holz ER. Long-term retinal toxicity of intravitreal commercially availabel preserved triamcinolone acetonide (Kenalog) in rabbit eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48:390-5.
- 108. Machida S, Kondo M, Jamison JA, Khan NW, Kononen LT, Sugawara T, Bush RA, Sleving PA. P23H rhodopsin transgenic rat: Correlation of retinal function with histopathology. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:3200–9.
- 109. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography. Doc Ophthalmol 118: 69-77, 2009.
- 110. Szurman P, Sierra A, Kaczmarek R, Jaissie GB, Wallenfels-Thillo B, Grisanti S, Lüke M, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS. Different biocompatibility of crystalline triamcinolone on retinal cells in vitro and in vivo. Exp Eye Res. 2007; 85:44-53.
- 111. Oliveira RC, Messias A, Siqueira RC, Bonini-Filho M, Haddad A, Damico FM, Maia-Filho A, Crispim PTB, Saliba JB, Ribeiro JAS, Scott IU, Cunha-Jr AS, Jorge R. Vitreous pharmacokinetics and retinal safety of intravitreal preserved versus non-preserved triamcinolone acetonide in rabbit eyes. Curr Eye Res 2012;37:55-61.
- 112. Yu SY, Damico FM, Viola F, D'Amico D, Young LH. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide- a morphological study. *Retina* 2006; 26:531-6.

- 113. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996;44:959–68.
- 114. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 1998;52:252–8.
- 115. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res 2000;* 874: 123–30.
- 116. Colombo J A, Puissant VI. Fluoro Jade Stains Early and Reactive Astroglia in the Primate Cerebral Cortex. J of Histochem & cytochem 2002;50: 1135–1137.
- 117. Duckworth EAM, Bulter TL, De Mesquita D, Collier SN, Collier L, Pennypacker KR. Temporary focal ischemia in the mouse: Technical aspects and patterns of Fluoro-Jade evident neurodegeneration. *Brain Res* 2005;1042: 29–36.
- 118. Bignami A, Dahl D. The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to glial fibrillary acidic (GFA) protein. Exp Eye Res 1979;28:63–9.
- 119. Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV. Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 1984;25: 1321–8.
- 120. Bringmann A, Kuhrt H, Germer A, Biedermann B, Reichenbach A. Müller (glial) cell development in vivo and in retinal explant cultures: morphology and electrophysiology, and the effects of elevated ammonia. J Hirnforsch 1998; 39:193–206.

- 121. Sarthy V. Focus on Molecules: Glial Fibrillary acidic protein (GFAP). Exp Eye Res 2007;84:381-2.
- 122. Erickson PA, Fisher SK, Guerin CJ, Anderson DH, Kaska DD. Glial fibrillary acidic protein increases in Muller cells after retinal detachment. Exp Eye Res 1987;44:37–48.
- 123. Barnett NL, Osborne NN. Prolonged bilateral carotid artery occlusion induces electrophysiological and immunohistochemical changes to the rat retina without causing histological damage. Exp Eye Res 1995;61:83-90.
- 124. Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G. Muller cell response to laser-induced in intraocular pressure in rats. Glia 2004;47:109-19.
- 125. Shahar J, Zemel E, Perlman I, Loewenstein A. Physiological and toxicological effects of cefuroxime on the albino rabbit retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;21:53:906-14.
- 126. Kai W, Yanrong J, Xiaoxin L. Vehicle of triamcinolone acetonide is associated with retinal toxicity and transient increase of lens density. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 244:1152-9.
- 127. Szurman P, Kaczmarek R, Spitzer MS, Jaissie GB, Decker P, Grisanti S, Henke-Fahle S, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU. Differential toxic effect of dissolved TA and its crystalline crystals on cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) cells. Exp Eye Res. 2006; 83:584-92.
- 128. Seigel, GM. Establishment of an E1A-immortalized retinal cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1996;32(2):66-8.

- 129. Seigel GM, Sun W, Wang J. Neuronal gene expression and function in the growth-stimulated R28 retinal precursor cell line. *Curr Eye Res.* 2004;28(4):257-69.
- Sun W, Seigel GM, Salvi RJ. Retinal precursor cells express functional ionotropic glutamate and GABA receptors. *Neuroreport* 2002; 13:2421-4.
- 131. Naka KI, Rushton WAH. S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprimidae). J Physiol (London) 1966; 185: 536-99.
- 132. Shaikh S, Ho S, Engelmann LA, Klemann SW. Cell viability effects of triamcinolone acetonide and preservative vehicle formulations Br J Ophthalmol 2006;90:233–236.
- 133. Oh J, Jung YS, Kim GS, Oh IK, Rho B, Huh K. The effect of short-term exposure of triamcinolone acetonide on fibroblasts and retinal pigment epithelial cells. Acta Ophthalmol. Scand. 2007: 85: 786–90.
- 134. Chang YS, Lin CF, Wu CL, Wu FS, Shieh CC, GEan PW, Chen ST, Chen MS, Wu WC, Tai MH, Tseng SH. Mechanisms underlying benzyl alcohol cytotoxicity (Triamcinolone acetonide preservative) in human retinal pigment epithelial cells. IOVS 2011; 52:4214-22.
- 135. Mullen W, Shepherd W, Labovitz J. Ophthalmic preservatives and vehicles. Surv Ophthalmol. 1973;17:469–483.
- 136. Brown WJ, Buits NR, Cory Gipson HT, Huston RK, Kennaway NG. Fatal benzyl alcohol poisoning in a neonatal intensive care unit. Lancet. 1982;1:1250.
- 137. Benda GI, Hiller JL, Reynolds JW. Benzyl alcohol toxicity: impact on neurologic handicaps among surviving very low birth weight infants. Pediatrics. 1986;77:507–512.

- 138. Morrison VL, Koh HJ, Cheng L, Bessho K, Davidson MC, Freeman W. Intravitreal toxicity of the kenalog vehicle (Benzyl Alcohol) in rabbits. *Retina* 2006; 26:339-44.
- 139. Walter P, Luck C, Sickel W. Antibiotics and light responses in superfused bovine retina. *Cell Mol Neurobiol.* 1999; 19:87-92.
- 140. Spitzer MS, Mlynczak T, Schultheiss M, Rinker K, Yoeruek E, Petermeier K, Januschowski K, Szurman P. Preservative-free triamcinolone acetonide injectable suspension versus "traditional" triamcinolone preparations. Impact of aggregate size on retinal biocompatibility. Retina 2011; 31: 2050-7
- 141. Garcia-Arumi J, Boixadera A, Giralt J, Martinez-Castillo V, Gomez-Ulla F, Corcostegui B, Garcia-Arumi E. Comparison of different techniques for purification of triamcinolone acetonide suspension for intravitreal use. *Br J Ophthalmol.* 2005; 89:1112-4.
- 142. Behl CR, Block LH, Borke ML. Aqueous solubility of 14C-triamcinolone acetonide. J. Pharm. Sci. 1976, 65, 429-30.
- 143. Gupta D, Ho PS. Some formal aspects of diffusion. Em: Gupta D, Ho PS. (Editores), Diffusion Phenomena in Thin Films and Microelectronic Materials. Noyes Publications, Park Ridge, Nova Jersei, EUA, 1988.
- 144. Zacharias LC, Estrago-Franco, MF, Ramirez C, Kenney MC, Takahashi W, Seigel G, Kuppermann BD. The effects of commercially available preservative-free FDA approved triamcinolone acetonide on retinal cells in culture. J Ocul Pharmacol Ther. 2011;27:143-50.
- 145. Tsai TI, Bui BV, Vingrys AJ. Dimethyl sulphoxide dose-response on rat retinal function. *Doc Ophthalmol.* 2009; 119:199-207.
- 146. Kim CH, Kang SU, Pyun J, et al. Epicatechin protects auditory cells against cisplatin-induced death. Apoptosis 2008;13:1184–1194.

- 147. Field MG, Yang D, Bian ZM, et al. Retinal flavoprotein fluorescence correlates with mitochondrial stress, apoptosis, and chemokine expression. Exp Eye Res 2011;93:548–555.
- 148. Ryu SY, Peixoto PM, Teijido O, et al. Role of mitochondrial ion channels in cell death. Biofactors 2010;36:255–263.
- 149. Zacharias LC, Damico FM, Kenney MC, Gasparin F, Aquesta FB, Ventura DF, Takahashi Wy, Kuppermann BD. In vitro evidence for mycophenolic acid dose-related cytotoxicity in human retinal cells. Aceito para publicação – Retina 2013.
- 150. Rezai KA, Farrokh-Siar L, Ernest JT, van Seventer GA. Indocyanine green induces apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. Am J Ophthalmol 2004;137:931–933.
- 151. 48. Hsu SL, Kao YH, Wu WC. Effect of indocyanine green on the growth and viability of cultured human retinal pigment epithelial cells. J Ocul Pharmacol Ther 2004;20:353–362.
- 152. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a Jaggregate-forming lipophilic cation JC-1. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:3671–3675.
- 153. Fauser S, Kalbacher H, Alteheld N, Koizumi K, Krohne TU, Joussen AM.

  Pharmacokinetics and safety of intravitreally delivered etanercept.

  Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2004;242:582-6.
- 154. Ishikawa T, Hokama H, Katagiri Y, Goto H, Usui M. Effects of intravitreal injection of tacrolimus (FK506) in experimental uveitis. Curr Eye Res. 2005;30:93-101.
- 155. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). Retina. 2006;26:257-61.

- 156. Gao H, Pennesi ME, Oiao X, Iyer MN, Wu SM, Holz ER, Mieler WF. Intravitreal moxifloxacin: retinal safety study with electroretinography and histopathology in animal models. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:1606-11.
- 157. Dayhaw-Parker P. Retinal pigment epithelium melanin and ocular toxicity. Int J Toxicol 2002;21:451-4.
- 158. Hughes PM, Krishnamoorthy R, Mitra AK. Vitreous disposition of two acycloguanosine antivirals in the albino and pigmented rabbit models: a novel ocular microdyalisis technique. J Ocul Pharmacol Ther 1996;12:209-24.
- 159. Cheruvu NP, Amrite AC, Kompella UB. Effect of eye pigmentation on transscleral drug toxicity. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008;49:333-41.
- 160. Neuringer M. Infant vision and retinal function in studies of dietary longchain polyunsaturated fatty acids: methods, results and implications. Am J Clin Nutr 2000; 71: 256-67.
- 161. Fulton AB, Hansen RM. The relationship of retinal sensitivity and rhodopsin in human infants. Vision Res 1987; 27: 697-704.
- 162. Massof RW, Wu L, Finkelstein D, Perry D, Starr SJ, Johnson MA. Properties of electroretinographic intensity-response functions in retinitis pigmentosa. Doc Ophthalmol 1984; 57: 279-96.
- 163. Birch DG, Herman WK, deFaller JM, Disbrow DT, Birch EE. The relationship between rod perimetric thresholds and full-field rod ERGs in retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 1987; 28: 954-65.
- 164. Fulton AB, Hansen RM. Scotopic stimulus/response relations of the b wave of the electroretinogram. Doc Ophthalmol 1988; 68: 293-304.
- 165. Armington JC, Gouras P, Tepas DI, Gunkel R. Detection of electroretinogram in retinitis pigmentosa. Exp Eye Res 1961; 1: 74-80.

- 166. Arden GB, Carter RM, Hogg GR. Rod and cone activity in patients with dominantly inherited retinitis pigmentosa: Comparison between psychophysical and electroretinographic measurements. Br J Ophthalmol 1983; 97: 405-18.
- 167. Hood DC, Shady S, Birch D. Understanding changes in the b-wave of the ERG caused by heterogeneous receptor damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 55: 2477-88.
- 168. Myers AC, Kjellstrom S, Bruun A, Isaksson B, Ghosh F, Andreasson S, Ponjavic V. Rifabutin accumulates in the lens and reduces retinal function in the rabbit eye. Retina 2009;29:106–11.
- 169. Rosolen SG, Rigaudiere F, Le Gargasson JF, Brigell MG. Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. Doc Ophthalmol 2005;110:57–66.
- 170. Tsilimbaris M, Diakonis VF, Naoumidi I, Charisis S, Kritikos I, Chatzithanasis G, Papadaki T, Plainis S. Evaluation of potential retinal toxicity of adalimumab (Humira). Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2009;247:1119–25.
- 171. Ekesten B, Gouras P, Moschos M. Cone properties of the light-adapted murine ERG. Doc Ophthalmol 1998;97:23–31.
- 172. Krishna VR, Alexander KR, Peachey NS. Temporal properties of the mouse cone electroretinogram. J Neurophysiol 2002;87:42–8.
- 173. Qian H, Shah MR, Alexander KR, Ripps H. Two distinct processes are evident in rat cone flicker ERG responses at low and high temporal frequencies. Experimental eye research 2008;87:71–5.
- 174. Alexander KR, Barnes CS, Fishman GA. ON-pathway dysfunction and timing properties of the flicker ERG in carriers of X-linked retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:4017–25.

- 175. Hare WA, Ton H. Effects of APB, PDA, and TTX on ERG responses recorded using both multifocal and conventional methods in monkey. Effects of APB, PDA, and TTX on monkey ERG responses. Doc Ophthalmol 2002;105:189–222.
- 176. Kondo M, Sieving PA. Primate photopic sine-wave flicker ERG: vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:305–12.
- 177. Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG. Inner-retinal contributions to the photopic sinusoidal flicker electroretinogram of macaques. Macaque photopic sinusoidal flicker ERG. Doc Ophthalmol 2002;105:223–2.
- 178. Wu S, Burns SA. Analysis of retinal light adaptation with the flicker electroretinogram. J Opt Soc Am Opt Image Sci Vis 1996;13:649–57.
- 179. Bush RA, Sieving PA. Inner retinal contributions to the primate photopic fast flicker electroretinogram. J Opt Soc Am A. 1996;13: 557–65.
- 180. Kozak I, Cheng L, Mendez T, Davidson M, Freeman WR. Evaluation of the toxicity of subretinal triamcinolone acetonide in the rabbit. Retina 2006;26:811-7.
- 181. Maia M, Penha FM, Farah ME, Dib E, Príncipe A, Lima Filho AA, Magalhães O Jr, Freymüller E, Rodrigues EB. Subretinal injection of preservative-free triamcinolone acetonide and supernatant vehicle in rabbits: an electron microscopy study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008;246:379-88.

8. Anexos



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17.11.2010, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 126/10 intitulado: "EFEITO DA APLICAÇÃO DE ACETATO DE TRIANCINOLONA SEM PRESERVATIVO (TRIESENCE®) **CÉLULAS** MORFOLÓGICO, EM DA **RETINA: ESTUDO ELETRORETINOGRÁFICO** CÉLULAS  $\mathbf{E}$  $\mathbf{EM}$ **CULTURA** DE RETINIANAS" que utilizará 30 coelhos, apresentado pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Walter Yukihiko Takahash Pesquisador (a) Executante: Leandro Cabral Zacharias

CEP-FMUSP, 17 denovembro de 2010.

Dr. Eduardo Pompeu Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Eduardo Massad Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo , 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: <a href="mailto:cep.fmusp@hcnet.usp.br">cep.fmusp@hcnet.usp.br</a>

JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS Volume 27, Number 2, 2011 © Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/jop.2010.0143

#### The Effects of Commercially Available Preservative-Free FDA-Approved Triamcinolone (Triesence®) on Retinal Cells in Culture

Leandro Cabral Zacharias, 1.2 Maria Fernanda Estrago-Franco, 1 Claudio Ramirez, 1 Maria Cristina Kenney, 1 Walter Y. Takahashi,<sup>2</sup> Gail M. Seigel,<sup>3</sup> and Baruch D. Kuppermann<sup>1</sup>

#### Abstract

Purpose: To evaluate the effects of Triesence® (TRI), a new preservative-free triamcinolone approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for intraocular use, on human retina pigment epithelial (ARPE-19) and rat neurosensory (R28) cells in culture.

Methods: ARPE-19 and R28 cell cultures were treated 24 h with 1,000, 500, 200, or 100 µg/mL of crystalline (cTRI) or 1,000, 500, or 200 µg/mL of solubilized (sTRI). TRI was solubilized by centrifuging the drug, discarding the supernatant containing the vehicle and then resuspending the drug pellet in an equivalent amount of Dimethyl sulfoxide to achieve the same concentration as the commercial preparation. Percentage of cell viability (CV) was evaluated by a trypan blue dye-exclusion assay. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ m) was analyzed with the JC-1 assay. The caspase-3/7 activity was measured by a fluorochrome assay.

Results: In the ARPE-19 cultures, the cTRI caused a decrease in CV at  $1,000 \,\mu\text{g/mL}$  ( $13.03 \pm 6.51$ ; P < 0.001),  $500 \,\mu\text{g/mL}$  ( $28.87 \pm 9.3$ ; P < 0.001),  $200 \,\mu\text{g/mL}$  ( $54.93 \pm 5.61$ ; P < 0.001), and  $100 \,\mu\text{g/mL}$  ( $82.53 \pm 0.65$ ; P < 0.005) compared with the untreated controls (96.98  $\pm$  0.16). In R28 cultures, the cTRI treatment also reduced CV values  $significantly \ (P < 0.001) \ for \ the \ 1,000 \ \mu g/mL \ (22.73 \pm 2.44), 500 \ \mu g/mL \ (34.63 \pm 1.91), 200 \ \mu g/mL \ (58.70 \pm 1.39), \ and \ (58$  $100 \,\mu\text{g/m}$  (75.33 ± 2.47) compared with the untreated controls (86.08 ± 3.54). Once the TRI was solubilized (sTRI), the CV and  $\Delta\Psi$ m remained similar to the untreated controls for both ARPE-19 and R28 cells. The sTRI treatment with 1,000, 500, and  $200\,\mu\text{g/mL}$  increased in caspase-3/7 activity in ARPE-19 cells (P < 0.01) and in R28 cells (P < 0.05) compared with dimethyl sulfoxide equivalent controls.

Conclusion: The crystalline form of TRI (cTRI) can cause a significant decrease in CV to cultured retinal cells. Once the TRI is solubilized (sTRI), at the same concentrations, the cells remain viable with no decrease in CV or ΔΨm. The sTRI can, however, increase caspase-3/7 activity, thus suggesting some degree of apoptosis.

#### Introduction

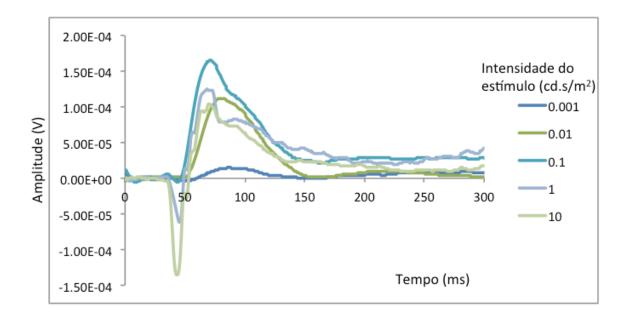
TRIAMCINOLONE ACETONIDE (1/A) is only one of the major RIAMCINOLONE ACETONIDE (TA) is only slightly soluble cavity 5 times longer than hydrocortisone. One of the major advantages of TA over the more potent steroid dexamethasone is the sustained release of minute amounts from its crystalline form.<sup>2</sup> As a result, TA suspension provides longer-lasting anti-inflammatory, antiproliferative, antiangiogenesis, and antipermeability effects compared with other steroid preparations. Over the last 5 years, it has become more widely used in treating a variety of vitreoretinal disorders,<sup>3–9</sup> such as diabetic macular edema, age-related

macular degeneration (in association with photodynamic therapy), cystoid macular edema related to uveitis, postcataract surgery, birdshot retinochoroidopathy, or after branch or central vein occlusion. In addition, TA in suspension is being used to visualize the prolapsed vitreous in complicated cataract surgery<sup>10,11</sup> and to facilitate the visualization of the vitreous,<sup>12–14</sup> posterior hyaloids,<sup>12</sup> epiretinal membrane,14 or internal limiting membrane15 during pars plana vitrectomy.

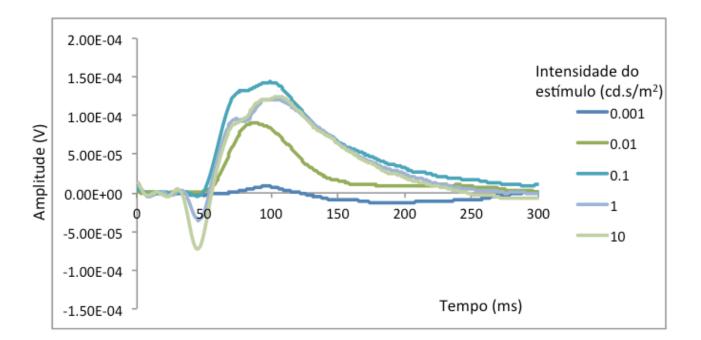
However, as an off-label application, its intraocular safety has long been a concern. 16 Kenalog (Brystol-Meyers-Squibb, Princeton, NJ), initially developed for intra-articular or intramuscular applications, is the most commonly used TA for

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Gavin Herbert Eye Institute, University of California, Irvine, California. <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Center for Hearing and Deafness, University at Buffalo, Buffalo, New York.

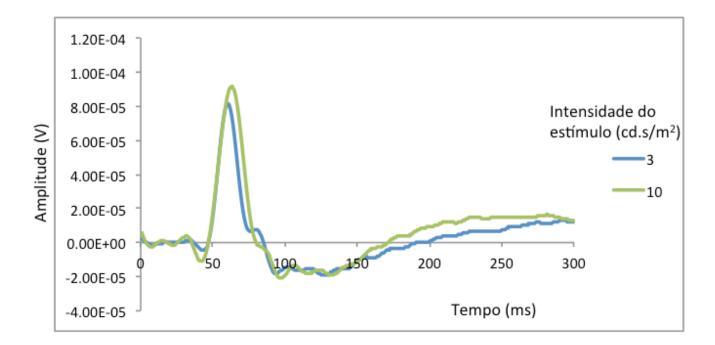
Curvas representativas dos diversos estímulos escotópicos realizados em animal aleatório pré- tratamento- olho direito



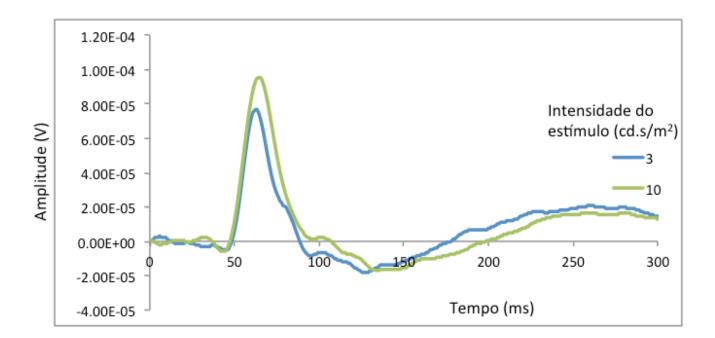
Curvas representativas dos diversos estímulos escotópicos realizados em animal aleatório após 30 dias da injeção intravítrea - olho direito



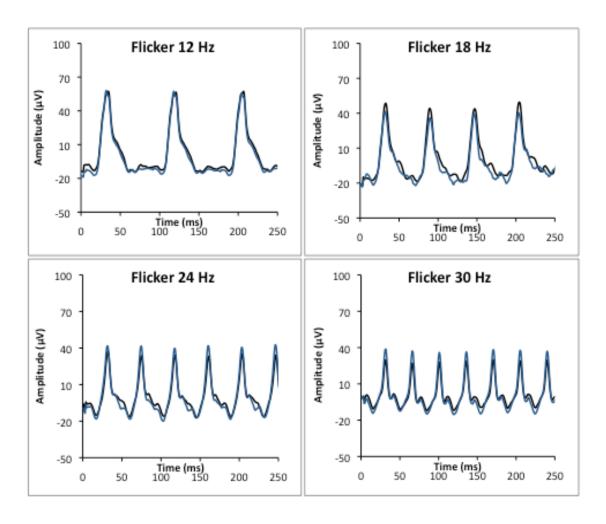
Curvas representativas dos diversos estímulos fotópicos realizados em animal aleatório pré- tratamento- olho direito



Curvas representativas dos diversos estímulos fotópicos realizados em animal aleatório após 30 dias da injeção intravítrea - olho direito



Curvas representativas dos estímulos fotópicos no padrão flicker realizados em animal aleatório, pré tratamento



Traçado azul: OD

Traçado preto: OE