

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos

Estael Luzia Coelho Madeira da Cruz

Ribeirão Preto
2014

RESUMO

CRUZ, E.L.C.M. **Avaliação de formulações de uso tópico a base de insulina no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos.** 2014. 125f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Distúrbios na superfície da córnea e nas glândulas lacrimais acometem com frequência os indivíduos com *diabetes mellitus*. Atualmente não existe tratamento seguro e eficaz para feridas na córnea e o tratamento da síndrome do olho seco (SOS) é predominantemente sintomático. A administração tópica da insulina (INS) é uma estratégia promissora para tratar esses distúrbios, devido à presença de seus receptores na superfície ocular e na glândula lacrimal, e aos seus efeitos metabólicos e mitogênicos. No entanto, os fármacos aplicados topicamente na forma de solução são rapidamente drenados do olho, resultando em uma baixa biodisponibilidade local. O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações contendo INS e avaliar a sua influência no distúrbio das glândulas lacrimais e na regeneração da córnea em ratos diabéticos. Foram desenvolvidas quatro formulações contendo 1 UI/mL de INS: dispersão contendo insulina (DISP INS), dispersão contendo micropartículas quitosana/INS (DISP MP INS), gel termorreversível *in situ* com INS (Gel INS) e Gel contendo as micropartículas quitosana/INS (Gel MP INS). Também foram produzidas formulações “brancas”, sem a veiculação do fármaco: dispersão contendo micropartículas sem insulina (DISP MP s/INS); gel termorreversível *in situ* sem insulina (Gel s/INS). As MP incorporadas nas formulações foram preparadas por *spray drying* e apresentaram tamanho de $4,0 \pm 0,1$ μm , morfologia adequada e grande quantidade de INS ($77 \pm 6\%$). Todas as formulações apresentaram pH e osmolalidade compatíveis com o uso ocular. Durante o estudo *in vivo*, foi realizado o tratamento diário (15 dias) dos animais diabéticos, com as formulações (50 μL) em ambos os olhos, exceto nos controles positivo (sem diabetes) e controle negativo (diabético não tratado). Todos os animais tratados com INS aumentaram a produção de fluido lacrimal, sendo que, ao término do tratamento, não foi observada diferença estatística entre o controle positivo e aqueles tratados com DISP INS e com Gel MP INS. A INS foi detectada na glândula lacrimal e no globo ocular dos animais tratados com DISP MP INS, Gel INS e Gel MP INS, sendo que a maior concentração de INS foi encontrada nos ratos tratados com Gel MP INS. Ao término do tratamento houve redução da glicemia dos animais tratados com a INS, o que pode sugerir um tratamento coadjuvante em pacientes diabéticos. Estudos de citologia de impressão mostraram que o Gel INS e Gel MP INS foram capazes de aumentar o número de células do epitélio da córnea e melhorar a relação núcleo/citoplasma em relação ao controle negativo. A histologia do globo ocular mostrou que essas duas formulações também melhoraram a espessura do epitélio da córnea, que foi semelhante a dos controles positivos. Conclui-se que a incorporação da INS nos géis e nas micropartículas desenvolvidas desempenhou um efeito positivo no tratamento da síndrome do olho seco e de lesões na córnea.

Palavras-chave: Insulina; Micropartículas; Gel termorreversível *in situ*; Síndrome do olho seco; Lesões na Córnea.

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM), juntamente com o envelhecimento, é provavelmente o principal fator de risco responsável por doenças no globo ocular (MOSS et al., 2000 + MOSS et al., 2004). Além das complicações bem conhecidas causadas por ele, como a catarata e a retinopatia diabética, sua relação com as alterações na superfície ocular e com os distúrbios no funcionamento das glândulas lacrimais tem sido muito discutida nos últimos anos (RAMOS-REMUS et al., 1994; GOEBBELS, 2000; DOGRU et al., 2001; KAISERMAN et al., 2005; ALVES et al., 2008). Sabe-se que o DM prejudica a secreção lacrimal e induz mudanças na glândula lacrimal e na superfície ocular, como observado em estudos experimentais e clínicos (ALVES et al., 2005 ; WAKUTA et al., 2007). No entanto, o mecanismo pelo qual essas alterações ocorrem ainda não está bem compreendido (AZAR et al., 1992; NEPP et al., 2000).

De acordo com Ishida et al. (1984), Rocha et al. (2000), Peponis et al. (2002) e Alves et al. (2005), a hiperglicemia crônica, o estresse oxidativo causado por ela, as alterações nervosas e os distúrbios na ação da insulina desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento dessas alterações na superfície ocular. Esses eventos contribuem para o dano tecidual e podem criar um ambiente inflamatório, com uma resposta não-específica, que aumenta e perpetua a lesão no tecido, tanto na superfície da córnea, retardando ou impedindo a sua cicatrização, como na glândula lacrimal, levando a síndrome do olho seco (SOS) (ALVES et al., 2008).

Apesar dos problemas relacionados à cicatrização de lesões na córnea serem considerados um dos distúrbios oculares de maior frequência mundial, representando a terceira maior causa de cegueira no mundo (TANDON et al., 2010), e da alta prevalência da síndrome do olho seco nos últimos anos, em torno de 5% à 33% dependendo da população em estudo (MILJANOVIC et al., 2007; LEMP, 2008). Não existe, atualmente, tratamento seguro e eficaz para a cicatrização da córnea (TANDON et al., 2010) e o tratamento para o olho seco é predominantemente sintomático (FONSECA et al., 2010).

Neste contexto, a descoberta da existência de receptores de insulina e da própria insulina na superfície ocular e na glândula lacrimal (FINI, 1999; ROCHA et al., 2000; ROCHA et al., 2002; KLENKLER e SHEARDOWN, 2004; CUNHA et al., 2005; ALVES et al., 2008; MODULO et al., 2009; YU et al., 2010; ABDELKADER et

al., 2011) apontam para uma possível participação deste hormônio no combate e/ou retardo das alterações ou doenças que acometem a superfície do globo ocular. De fato, a insulina tem sido alvo constante de pesquisas envolvendo a promoção da cicatrização da córnea (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2006; CUNHA et al., 2007; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; YU et al., 2010; BASTION e LING, 2013; HAMPEL et al., 2013) e, também, mostrou ser promissora na prevenção de lesões na glândula lacrimal (MODULO et al., 2009).

A insulina exerce importantes efeitos metabólicos e mitogênicos sobre diversos tecidos alvos. Ela influencia no afluxo de nutrientes, armazenamento de energia, expressão gênica, síntese de proteínas e sinalização de mediadores intracelulares (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2007; ALVES et al., 2008). Seu papel no controle metabólico e suas vias de sinalização, que regem a mitose e a proliferação do tecido, são relevantes para a homeostase da córnea (MODULO et al., 2009). Estudo recente realizado por Modulo et al. (2009) com ratos diabéticos verificou que a aplicação subcutânea de baixas doses de insulina, além de induzir a mitose e a proliferação celular, relevantes para a promoção da cicatrização da córnea, foi capaz de retardar o surgimento de algumas modificações bioquímicas e estruturais presentes nas glândulas lacrimais dos animais.

No entanto, sabe-se que a administração subcutânea é invasiva e não localizada, pouco conveniente para os pacientes, além de causar dor, ferimentos e fobia de agulhas. Desta forma, o desenvolvimento de formulações destinadas à aplicação tópica da insulina, localizada na superfície do olho, pode evitar os problemas relacionados à administração injetável invasiva e trazer benefícios tanto para o tratamento de lesões na córnea como para a síndrome do olho seco. Porém, a maior parte dos fármacos aplicados topicamente é drenada do olho através de vários mecanismos, como a lacrimejação, a diluição do fármaco pela lágrima e a renovação da lágrima, resultando numa baixa biodisponibilidade dos mesmos (GAUDANA *et al.*, 2009). A biodisponibilidade local da insulina pode ser aumentada com a administração de formulações que aumentem seu tempo de residência na superfície do olho, bem como facilitem sua penetração nas glândulas lacrimais e nas células da córnea. Sendo assim, este trabalho propõe desenvolver essas formulações e avaliar seu efeito na melhora dos sintomas da síndrome do olho seco e na cicatrização de lesões na córnea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estrutura do globo ocular humano

2.1.1. Anatomia ocular

Responsável por proporcionar o sentido da visão, o globo ocular humano é formado por um complexo sistema ótico, capaz de detectar a luz e transformar essa percepção em impulsos elétricos a serem processados e interpretados no cérebro (GEORGIEV, 2011). Protegido pelas pálpebras e células de gordura, está situado dentro de uma cavidade óssea denominada órbita. A órbita aloja também outras estruturas do tecido mole e anexos oculares, como os músculos e as glândulas (LUDWIG, 2005) (Figura 1).

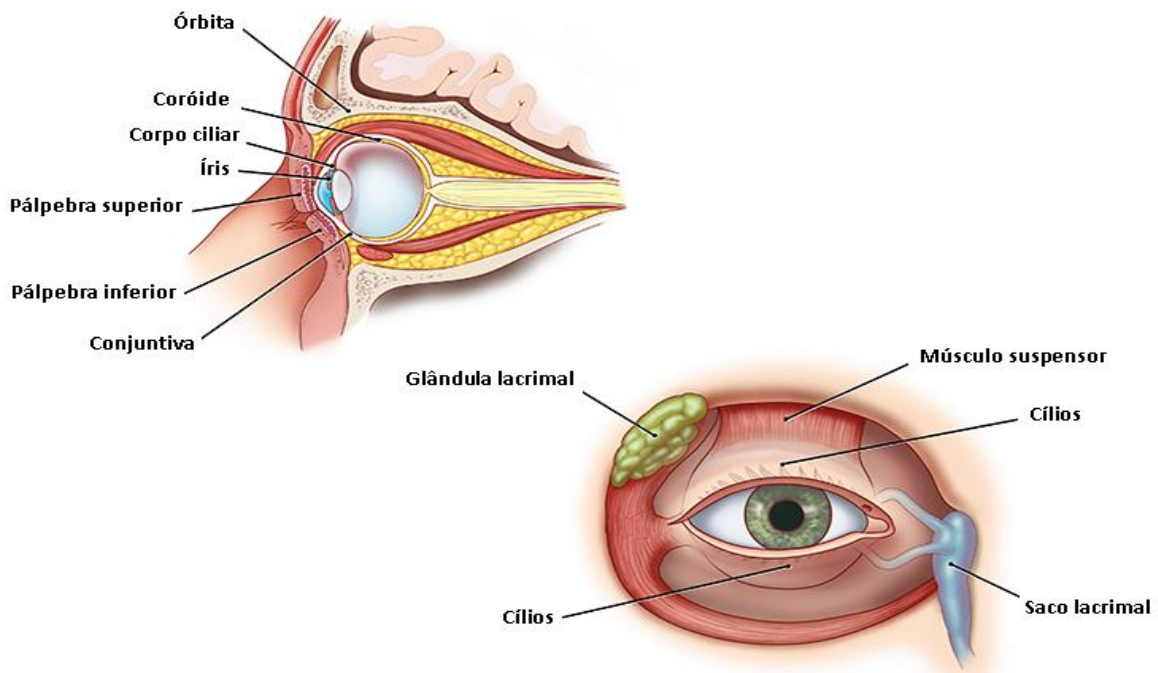


Figura 1: Anatomia do globo ocular, estrutura e anexos (Adaptado de Visual Art:© 2013 The University of Texas MD Anderson Cancer Center).

O globo ocular possui, na idade adulta, aproximadamente 24 mm de diâmetro anteroposterior e 12 mm de largura, formando uma esfera ligeiramente assimétrica (LUDWIG, 2005). Essas dimensões são praticamente constantes, variando apenas um ou dois milímetros entre diferentes indivíduos. Anatomicamente, o globo ocular pode ser dividido em duas porções, o segmento anterior e o posterior. O segmento anterior do olho é formado pelo cristalino, corpo ciliar, câmara anterior e posterior,

íris e córnea, enquanto o segmento posterior inclui o corpo vítreo, a retina e a coroide (OGURA, 2001). No presente trabalho daremos ênfase às estruturas pertencentes ao segmento anterior do olho, objeto de estudo, que serão descritas detalhadamente a seguir.

2.1.2. Estruturas que compõe o segmento anterior do globo ocular e as suas funções

O segmento anterior do olho é delimitado internamente pelo cristalino, também conhecido como lente. Trata-se de um disco biconvexo, transparente, constituído por numerosas camadas de fibras proteicas e elásticas, que focam os raios de luz na retina (McCAA, 1982). Anatomicamente, está situado entre a câmara posterior e o humor vítreo, e é mantido na posição correta por um conjunto de fibras orientadas radialmente, denominado zônula ciliar, as quais se inserem de um lado na cápsula do cristalino e do outro no corpo ciliar (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O formato do cristalino está diretamente relacionado com a visão de objetos a pequenas e grandes distâncias. Para visualizar objetos a mais de seis metros os ligamentos suspensores tracionam a região equatorial do cristalino, causando um achatamento anteroposterior da lente, o que diminui a refração dos raios. Já para objetos mais próximos, observa-se a redução da tração sofrida pelos ligamentos suspensores, devido à contração dos músculos ciliares do corpo ciliar, fazendo com que o cristalino assumira uma forma mais esférica (LEITE et al., 2013).

Além da sustentação e acomodação do cristalino, o corpo ciliar também é responsável pela produção do humor aquoso no segmento anterior do bulbo do olho (MACRI e CEVARIO, 1975). O humor aquoso é um líquido transparente, basicamente um ultrafiltrado do sangue, que preenche tanto a câmara posterior, situada entre o cristalino e a íris, quanto a câmara anterior, entre a íris e a córnea (EITHER et al., 2004). Sua taxa de produção e absorção é suficientemente elevada para repor o volume total das câmaras e manter a pressão intra-ocular constante (McCAA, 1982). O humor aquoso além de ajudar na manutenção da forma do globo ocular é responsável pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes ao cristalino e à córnea (MACRI e CEVARIO, 1975; JARVINEN et al., 1995).

Entre o cristalino e a córnea, e dividindo a câmara na porção anterior e posterior, tem-se a íris, porção colorida do olho. Sua principal função é o controle da

entrada de luz, o que é realizado através de um orifício central denominado pupila. É a pupila que permite a comunicação da câmara posterior com a anterior e que muda de tamanho de acordo com a variação da intensidade da luz ambiente, contraindo sob luz forte e dilatando sob luz fraca (EITHER et al., 2004) (Figura 2). E, por último, compondo o segmento anterior do olho mais externamente, tem-se a córnea, cuja estrutura e função serão detalhados a seguir.

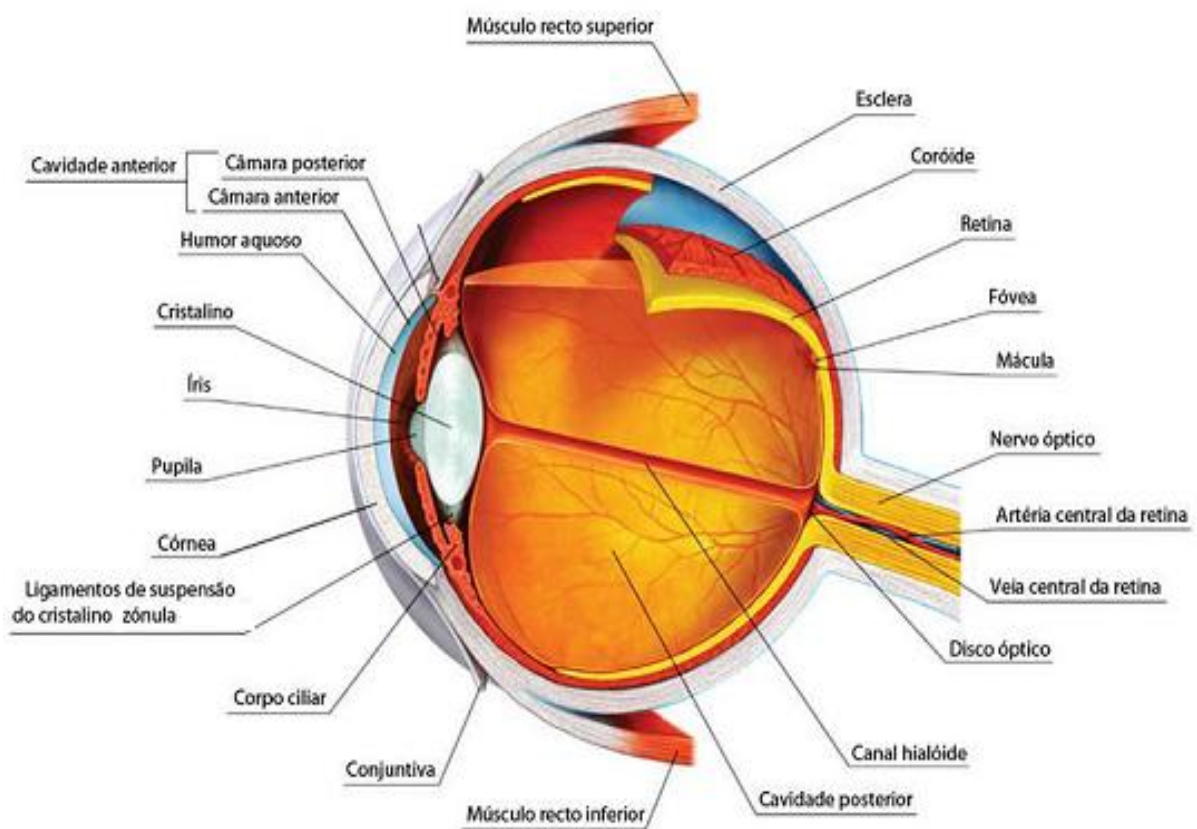


Figura 2: Anatomia detalhada do olho humano (Adaptado de Visual Medical Center©).

CÓRNEA

A córnea é uma estrutura transparente e avascular que está exposta diretamente ao meio externo. Suas principais funções são refratar a luz e proteger as estruturas oculares internas mantendo assim, a integridade física do olho (KLAUSNER et al., 2007). É considerada o elemento refrativo primário do sistema visual, contribuindo com 70 a 80% do poder de refração total do olho (KONRADE et al., 2012). Sua curvatura e transparência são elementos essenciais para a

passagem de luz para a retina e, portanto, para manter a visão (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001).

Anatomicamente, a face anterior da córnea é elíptica e mede, no indivíduo adulto, aproximadamente 12,6 mm, na horizontal e 11,7 mm, na vertical. Possui uma espessura variável no centro e na periferia, de 520 μm e 650 μm , respectivamente. Sua curvatura não é uniforme, sendo mais curva na região central, com um raio de 7,8 mm e mais plana na região periférica, com raio de curvatura de 6,6 mm (BROWN et al., 2006).

Histologicamente a córnea é constituída por cinco camadas, da mais interna para mais externa são, respectivamente: endotélio, membrana de Descemet, estroma, membrana de Bowman e epitélio; com estruturas e propriedades bem diferenciadas entre si (MUCCIOLI, et al., 2006; KLAUSNER et al., 2007) (Figura 3).

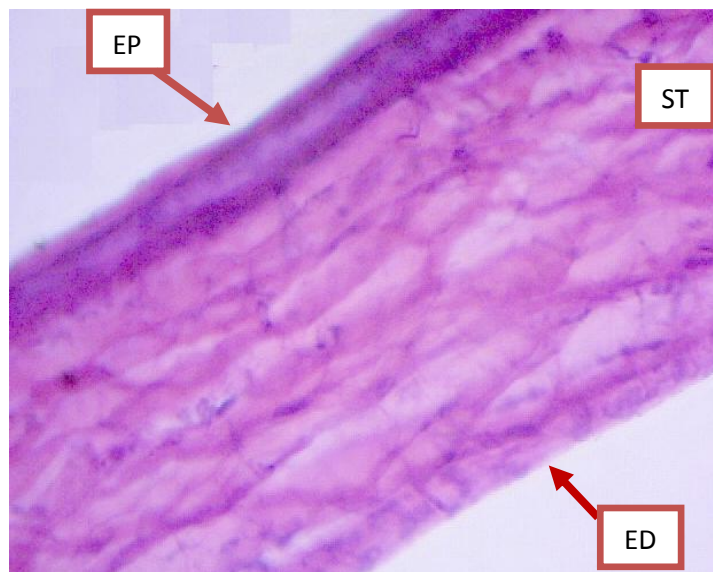


Figura 3: Histologia da córnea de rato, demonstrando as camadas do epitélio (EP), estroma (ST) e endotélio (ED). Lâmina corada com Hematoxilina-eosina, aumento de 40 x, animal diabético tratado com gel termorreversível *in situ* contendo insulina, obtida durante o presente estudo.

ENDOTÉLIO

O endotélio é a camada mais interna da córnea, constituído por uma camada única de células hexagonais, com cerca de 5 μm de altura e 20 μm de largura, em formato de mosaico. Esta camada é responsável por manter o grau de desidratação constante das demais camadas da córnea, essencial para a manutenção da transparência corneana (GRASS e ROBINSON, 1988). O que só é possível devido a

ação das bombas de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2008; HOFFMAN et al., 2009) e anidrase carbônica, que removem a água da córnea a uma velocidade de $6,5 \mu\text{L}/\text{cm}/\text{h}$ (GRASS e ROBINSON, 1988). A nutrição do endotélio é realizada pelo humor aquoso que fornece oxigênio e glicose, possivelmente por transferência facilitada (JARVINEN et al., 1995).

As células endoteliais possuem baixa (RODRIGUES et al., 2006) ou nenhuma capacidade de regeneração e replicação (PATEL e McGHEE, 2005). Esta característica causa, ao longo dos anos, a diminuição da população celular local, assim como a redução de sua espessura. Uma vez que as células endoteliais não realizam mitose, quando há algum tipo de lesão, as estruturas remanescentes aumentam de tamanho (polimegatismo) e/ou alteram a sua forma (pleomorfismo) com o intuito de preencher a área lesionada (AGRAWAL e TSAI, 2003; KLAUSNER et al., 2007). De acordo com Mishima (1982), a falência progressiva do tecido endotelial pode provocar o edema da córnea, com perda localizada de sua transparência e o comprometimento da acuidade visual. Algumas doenças oculares de alta prevalência, como o glaucoma, uveítes, traumas oculares e ceratocone, são capazes de alterar a morfologia desta camada, comprometendo a sua função (FRANZEN et al., 2010).

MEMBRANA DE DESCOMET

Acima do endotélio tem-se a membrana de Descemet. Estrutura acelular composta por colágeno e glicoproteínas que são continuamente sintetizadas e excretadas pelo endotélio. Possui uma espessura variável com a idade, aumentando ao longo da vida, sendo de $3 \mu\text{m}$ nos recém nascidos e $8-10 \mu\text{m}$ nos adultos. Esta membrana é muito resistente, podendo permanecer intacta mesmo em casos graves de ulceração corneal (PATEL e McGHEE, 2005).

ESTROMA

O estroma corresponde a, aproximadamente, 90% da espessura total da córnea (cerca de $450 \mu\text{m}$) e está localizado acima da membrana de Descemet (NAGAYASU et al., 2009). É basicamente composto por fibras colágenas e uma matriz extracelular de proteoglicanas, com uma estrutura altamente organizada. A

disposição regular das fibras colágenas nesta camada está diretamente relacionada à manutenção da transparência da córnea (PATEL e McGHEE, 2005). O estroma possui baixa densidade de células, correspondendo a menos de 3% da sua composição (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001), das quais destacam-se os queratinócitos. Quando há uma lesão, os queratinócitos podem se transformar em dois fenótipos reparadores: os fibroblastos e os miofibroblastos, que produzem os precursores do colágeno e da matriz (MYRNA et al., 2009) e reparam o tecido (KLAUSNER et al., 2007). O estroma possui caráter hidrofílico e é osmoticamente ativo, atraindo água para o seu interior, o que possibilita a passagem de substâncias hidrofílicas e dificulta a passagem de substâncias lipofílicas (SCHOENWALD, 1990).

MEMBRANA DE BOWMAN

A camada de Bowman é acelular e homogênea, composta de fibras colágenas, que estão dispostas em estratos na zona central, mas sem estratificação aparente na zona periférica, e de proteoglicanas (KLAUSNER et al., 2007). Possui de 8 a 16 μm de espessura e não possui a capacidade de regeneração (PATEL e McGHEE, 2005). Quando ocorre uma lesão nesta estrutura, sua transparência é rapidamente comprometida, reduzindo a acuidade visual. Esta camada atua como uma barreira para a entrada de microrganismos e células tumorais e na manutenção da integridade e da organização da camada superior da córnea, o epitélio. Ainda, na membrana de Bowman existem poros que possibilitam a passagem de ramos terminais que fornecem a inervação corneana (MCLEAN, 1994).

EPITÉLIO

O epitélio é a camada mais superficial da córnea. Constitui cerca de 10% da sua espessura total, o que corresponde a aproximadamente 50 μm (KLAUSNER et al., 2007). É responsável pela absorção de nutrientes e oxigênio, bem como pela proteção das estruturas internas oculares (DANIELS et al., 2001). O tecido epitelial é formado por cinco a sete camadas de células não queratinizadas (KLAUSNER et al., 2007), que se agrupam em três categorias: células superficiais, células intermediárias e células basais, constituindo o epitélio estratificado pavimentoso (PATEL e McGHEE, 2005).

As células superficiais são poligonais e achatadas com, aproximadamente, 4 a 6 μm na região dos núcleos e de 2 μm na região periférica. Apresentam microvilosidades que aumentam a sua superfície de contato com o fluido lacrimal, de onde retiram parte da sua nutrição (NISHIDA et al., 1998). A principal função dessas células, que estão em contato com o meio externo, é atuar como barreira à penetração de substâncias estranhas. Isto só é possível devido a um complexo sistema de adesão intercelular, realizado pelos desmossomos, denominado “*zônula ocludens*” (WATSKY, 1999; PATEL e MCGHEE, 2005). O sistema de adesão evita também a descamação prematura e excessiva das células epiteliais da córnea (WATSKY, 1999).

As células intermediárias possuem um formato alongado, com um núcleo tipicamente ovalado. São constituídas por duas ou três camadas que repousam sobre as células basais, as quais estão fortemente aderidas devido à ação de desmossomos locais (WATSKY, 1999). Já as células basais, camada celular mais interna, são colunares, com 18 a 20 μm de altura e 8 a 10 μm de diâmetro. São as células que possuem maior atividade celular, com alta taxa de mitose (LU et al., 2001). De rápida replicação e autorregenerativas, são completamente substituídas em um período de cinco a sete dias (KLAUSNER et al., 2007). Acredita-se que os grânulos de glicogênio presentes no seu citoplasma sirvam como reserva energética para a atividade mitogênica, o que possibilita a rápida renovação celular (KINOSHITA et al., 2001; LU et al., 2001).

Sabe-se que, fisiologicamente, as camadas mais superficiais da córnea são liberadas no filme lacrimal, necessitando, portanto, da sua substituição e reposição, o que é realizado pelas células basais (EVANS et al., 2005). Existem algumas teorias que explicam essa movimentação celular. A primeira delas foi descrita por Thoft e Friend (1983), conhecida como a hipótese “X, Y e Z”. Nesta teoria o “X” representa a proliferação das células epiteliais basais; “Y” a proliferação e migração centrípeta das células epiteliais límbicas, presentes na região que separa a córnea da esclera; e “Z” a perda celular epitelial da superfície. Sendo que, para manter um estado de equilíbrio é necessário que “X” + “Y”, resultem em “Z”. Outra teoria, de Nagasaki e Zhao (2003), descreve que as células epiteliais das camadas basais e suprabasais são capazes de se mover centripetamente a uma velocidade de 26

$\mu\text{m}/\text{dia}$, o que garante o processo de renovação contínua do epitélio corneano, um processo fisiológico, necessário para a manutenção da estrutura da córnea (LU et al., 2001).

FILME LACRIMAL

A parte exposta do globo ocular é recoberta por uma fina camada de fluido, denominado fluido ou filme lacrimal. Com um volume aproximado de 7,0 a 10 μL (WEI et al., 2002; HAO et al., 2010) e espessura de 7 a 40 μm (CREECH et al., 1998), é considerado por Hartley et al. (2006) e Davidson e Kuonen (2004) como uma estrutura contendo sete principais funções, sendo elas: manutenção de uma superfície ocular plana, ideal para a refração da luz; lubrificação das pálpebras; lubrificação da conjuntiva e da córnea; fornecimento de nutrientes e oxigênio a córnea; remoção de metabólitos, células mortas e materiais estranhos; defesa contra microrganismos; defesa contra agentes externos.

Inicialmente descrito por Wolff (1946), o fluido lacrimal é caracterizado como uma estrutura composta por três camadas, da mais interna para a mais externa, são elas: camada basal de mucina, camada aquosa central e camada lipídica superficial (PATEL e FARREL, 1989) (Figura 4).

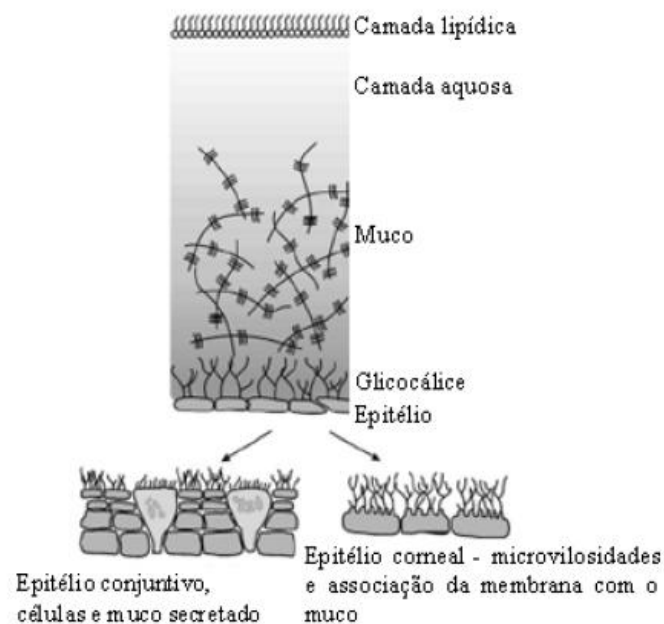


Figura 4: Representação esquemática do fluido lacrimal pré-corneal (Adaptado de LUDWIG, 2005).

A camada de mucina está intimamente associada às células epiteliais da córnea e da conjuntiva, e constitui cerca de 0,2% do volume total do fluido lacrimal (WALLCOTT, 1998). É formada pelas criptas de Henle, glândulas de Manz, células epiteliais corneanas (DAVIDSON e KUONEN, 2004) e, principalmente, pelas células caliciformes da conjuntiva (HARTLEY et al., 2006). Seu principal componente é a glicoproteína denominada mucina, porém também fazem parte do muco as imunoglobulinas, ureia, sais, glicose, leucócitos, restos celulares e enzimas (LUDWIG, 2005).

Essa camada atua como uma interface entre a superfície ocular, representada pelo epitélio da córnea e da conjuntiva, que são hidrofóbicos, e a camada aquosa do filme lacrimal, que é hidrofílica, facilitando assim a dispersão do filme por toda a superfície ocular de maneira uniforme (DAVIDSON e KUONEN, 2004; HARTLEY et al., 2006). Da mesma forma que é responsável pela coesão e estabilidade do fluido lacrimal (WATANABE, 2002), esta camada funciona também como a principal barreira à contaminação bacteriana (LUDWIG, 2005) e a difusão de macromoléculas (KHANVILKAR et al., 2001). Alterações nesta camada estão diretamente associadas a prejuízos na tensão superficial e na estabilidade da lágrima.

A camada aquosa, por sua vez, representa 99,78% do volume total do fluido lacrimal (WALLCOTT, 1998). É produzida pelas glândulas lacrimais principais (70%) e acessórias (30%) (HARTLEY et al., 2006). Sua principal função é o transporte de nutrientes solúveis em água como glicose, ureia, retinol, ácido ascórbico; e a remoção de substâncias estranhas. No entanto, também estão presentes nesta camada substâncias bactericidas, tais como imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, β -lisina e defensinas (BAEYENS e GURNY, 1997; NAGYOVA e TIFFANY, 1999), além de componentes essenciais para a proliferação e diferenciação do epitélio corneano, como os fatores de crescimento e vitamina A (DAVIDSON e KUONEN, 2004; McCULLEY et al., 2006; HARTLEY et al., 2006).

A camada lipídica é a mais externa do filme lacrimal e corresponde a apenas 0,02% de seu volume total (WALLCOTT, 1998). É secretada pelas glândulas de Zeiss, Moll e, principalmente pelas glândulas de meibômio, que se localizam nas pálpebras (STEVES et al., 1994). Essa camada é composta por lipídeos polares e apolares, sendo que a fração polar tem propriedades tensoativas, espalhando-se pela camada aquosa do filme lacrimal; enquanto a apolar permanece em contato

com o meio externo (HARTLEY et al., 2006). Tem como função retardar a evaporação da lágrima e estabilizar o filme lacrimal, a fim de produzir uma superfície óptica plana (STEVES et al., 1994; HARTLEY et al., 2006), além de prevenir a contaminação do filme lacrimal por corpos estranhos e restos celulares (DAVIDSON e KUONEN, 2004).

No filme lacrimal é possível identificar ainda alguns hormônios como a insulina, prolactina e hormônio da tireoide, bem como diversos eletrólitos como Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , HCO_3^- (OHASHI et al., 1989; SULLIVAN e HANN, 1989; ROCHA et al., 2002). É justamente a presença e a concentração desses eletrólitos que determinam a osmolalidade e o pH do fluido lacrimal (HOLLY e ESQUIVEL, 1985). Em números, fisiologicamente, o olho humano possui uma osmolalidade média de 302 ± 9.7 mOsm/Kg (TOMLINSON et al., 2006) e um pH entre 6,5 e 7,6 (SMOLIN; THOFT, 1987).

Assim, conhecendo a fisiologia da córnea e a estrutura do filme lacrimal, e compreendendo que eles constituem uma unidade funcional única, considerada a principal superfície refrativa do olho humano (HUANG et al., 2002), pode-se categorizar agora de maneira mais concisa algumas doenças que acometem a superfície ocular.

2.2. Doenças associadas ao segmento anterior do olho

2.2.1. Síndrome do olho seco

A síndrome do olho seco, também conhecida como *ceratoconjuntivite sicca*, é uma doença multifuncional das lágrimas e da superfície ocular (DEWS, 2007), caracterizada por alterações quantitativas e/ou qualitativas do filme lacrimal (PATEL e FARREL, 1989). Nesta síndrome, são observados sintomas de desconforto, perturbação visual e instabilidade da lágrima, com dano potencial à superfície ocular (DEWS, 2007). Sua prevalência varia de 5 a 33% na população em geral, cuja variabilidade depende do desenho do estudo e das características da população analisada (BANDEEN-ROCHE et al., 1997; LEE et al., 2002; LEMP, 1998; SCHAUMBERG et al., 2002; LIN et al., 2005; DEWS, 2007).

Há muitos anos, a SOS é considerada como uma das condições clínicas mais frequentes na prática oftalmológica diária (BREWITT e SISTANI, 2001; DEWS, 2007; MILJANOVIC et al., 2007; LEMP, 2008; FONSECA et al., 2010). De acordo com

Gayton (2009), 25% dos pacientes que buscam atendimento oftalmológico apresentam sintomas da síndrome do olho seco. Hoje ela é considerada a segunda alteração mais comum que acomete o tecido conjuntivo, ficando atrás somente da artrite reumatoide (LEMP, 2008).

De acordo com o *Dry Eye Workshop* (DEWS, 2007), de maneira simplificada, a SOS pode ser dividida em duas principais categorias, levando em consideração a origem da doença. A primeira categoria está relacionada à deficiência da porção aquosa do filme lacrimal e a segunda às alterações evaporativas observadas na superfície ocular. Quando a SOS ocorre devido à deficiência aquosa, ela pode estar relacionada à manifestação de doenças autoimunes, como por exemplo, a *Síndrome de Sjögren*, ou ser decorrente da deficiência da glândula lacrimal, obstrução do ducto lacrimal, hiposecreção reflexa e uso de certos tipos de medicamentos. Porém, quando relacionada ao estado evaporativo, esta pode ocorrer devido às disfunções nas glândulas de Meibômio, desordens do fechamento palpebral, baixa frequência ao piscar, ação sistêmica de fármacos, uso de lente de contato e deficiência de vitamina A.

De uma maneira geral, a baixa qualidade e quantidade de fluido lacrimal pode provocar a inflamação crônica da córnea, conjuntiva e das glândulas lacrimais. Pode também comprometer o deslizamento normal das pálpebras, o que torna deficiente ou nula a função protetora do fluido lacrimal, propiciando assim infecções secundárias, que podem evoluir para destruição tecidual e cegueira (GILBARD et al., 1987).

Na superfície ocular, especificamente, a SOS propicia o desenvolvimento de um ambiente inflamatório mediado pelas células epiteliais da córnea e os linfócitos. Essas células são estimuladas a produzir e a secretar diversas citocinas pró-inflamatórias, que associadas à redução dos promotores de crescimento provocada pela própria síndrome, tais como o fator de crescimento epidermal (EGF) e o retinol, reduzem a proliferação e diferenciação epitelial da córnea. Essa queda acentuada da atividade mitótica local representa um obstáculo para o processo fisiológico de regeneração da córnea. Além disso, também é observada a redução da produção de mucina e de células caliciformes, bem como o aumento do número de células metaplásicas e da queratinização epitelial (TSENG et al., 1997; SOLOMON et al., 2001; ZOUKHRI e KUBLIN, 2001).

De acordo com alguns autores, a hiperosmolalidade é o primeiro sinal de desconforto, dano na superfície ocular e inflamação observada na SOS (TOMLINSON et al., 2006; DEWS, 2007). Os pacientes apresentam uma osmolalidade da lágrima aumentada, sendo geralmente superior a 316 mOsmol/Kg (TOMLINSON et al., 2006). Também é observado alteração do pH do filme lacrimal, cuja média nos pacientes saudáveis é de 7,4, e nos que podem apresentar SOS é de 7,9 (FARRIS et al., 1996; TOMLINSON et al., 2006).

Embora haja portadores assintomáticos, a maioria dos indivíduos com a SOS apresentam sintomas como: sensação de corpo estranho, queimação, prurido, ardor, fotofobia e embaçamento visual, que causam um impacto negativo na qualidade de vida destes pacientes (MILJANOVIC et al., 2007). Além disso, essa síndrome ainda pode resultar em sérias complicações oftalmológicas, como ressecamento epitelial, úlceras e perfurações na córnea, predisposição a infecções e até cegueira (LEMP, 1995 SULLIVAN et al., 1999).

2.2.2. Lesões no epitélio corneano

A córnea é a estrutura mais externa do globo ocular que está em contato direto com o meio ambiente, sendo recoberta apenas pelo fluido lacrimal (KLAUSNER et al., 2007). Essa exposição constante torna-a mais suscetível a sofrer danos ou lesões, principalmente de origem traumática (físico ou químico) e infecciosa. Porém, esses não são os únicos fatores que desencadeiam as lesões na córnea. Fatores intrínsecos como alterações metabólicas, processos degenerativos, ceratocone e aumento da pressão intra-ocular também estão relacionadas ao dano tecidual local (SLATTER e DIETRICH, 2007).

Independente da origem e do grau da lesão, logo após o comprometimento da superfície ocular, é de fundamental importância que se inicie o processo de cicatrização, com o intuito de reestabelecer a integridade da superfície da córnea e, conseqüentemente, a sua transparência, qualidade ótica e função de barreira (KURPAKUS-WHEATER et al., 2001; LU et al., 2001). Quando a lesão ocasionada gera a perda de uma ou mais camadas superficiais do epitélio corneano é denominada erosão ou abrasão. No entanto, quando é observada a perda total do epitélio, com o comprometimento ou não do estroma, é considerada úlcera (KERN, 1994).

Em condições normais, imediatamente após a lesão na córnea tem-se início o processo de cicatrização, que é, basicamente, a amplificação do processo fisiológico de regeneração, descrito no item 2.1.3.. No entanto, envolve ainda interações entre as células epiteliais, estromais, a glândula lacrimal e as células do sistema imunológico (LU et al., 2001). Didaticamente, o reparo de lesões na córnea pode ser dividido em três fases, de acordo com o tipo de fenômeno preponderante: migração, proliferação e adesão epitelial. Porém, todos esses eventos são interdependentes e ocorrem simultaneamente (DUA et al., 1994; LU et al., 2001). A intensidade da contribuição de cada um é que varia de acordo com a área, a profundidade e a causa da lesão (DUA et al., 1994).

Logo após o comprometimento celular observa-se a cessação da atividade mitótica local. Neste primeiro momento, ocorre a migração celular tanto de células epiteliais intactas presentes na periferia da lesão, como de células da camada basal da córnea. As primeiras se tornam achatadas e as suas membranas emitem processos digitiformes (*filopodia*) ou coraliformes (*lamellipodia*), em direção à ferida (CROSSON et al., 1986). As células basais, devido a um rearranjo das fibras de actina, migram com movimentos amebóides para a superfície ocular (GIPSON et al., 1982).

Em seguida, evidencia-se uma intensa atividade mitótica (HANNA e O'BRIEN, 1960; LU et al., 2001), dando início a fase proliferativa. Esta fase ocorre entre 24 e 30 horas após a lesão (NISHIDA et al., 1983) e permanece até que a espessura epitelial seja restabelecida. Nesta etapa, que pode se prolongar durante meses após a lesão, observa-se, ainda, o aumento da concentração de fibronectina, fibrinogênio e fibrina, importantes na adesão celular (LU et al., 2001; FILENIUS et al., 2003). Ao término da reepitelização, as "junções ocludentes" se refazem e restauram a permeabilidade seletiva do epitélio (LU et al., 2001).

As células do sistema imune e a glândula lacrimal também exercem papel fundamental no processo de cicatrização do epitélio corneano. De acordo com Wilson et al. (1996), são as citocinas liberadas logo após as lesões que ativam o processo de regeneração epitelial. A interleucina-1 (IL-1), por exemplo, modula a apoptose dos queratinócitos e fibroblastos corneanos, regula a produção de fatores de crescimento e a expressão de metaloproteinases. Mecanismos estes que estão

diretamente envolvidos na proliferação, motilidade e diferenciação das células do epitélio e na remodelação da matriz estromal corneana (STRISSEL et al., 1997).

Já a glândula lacrimal induz a produção do fator de crescimento de hepatócito (HGF), diretamente relacionado com a migração celular, e do fator de crescimento epidermal (EGF), potente ativador do processo de mitose (LI e TSENG, 1995). Juntos, HGF e EGF modulam a regeneração epitelial (TERVO et al., 1997; WILSON et al., 1999). A glândula lacrimal regula também, principalmente nas primeiras etapas da cicatrização, a liberação e produção da IL-1 (WILSON et al., 2001).

A última etapa do processo de cicatrização da córnea depende do grau de comprometimento da lesão. Quando se trata de lesões superficiais, a completa restauração da arquitetura normal do epitélio pode ocorrer em cinco a sete dias, se não ocorrer infecção. Porém, quando a lesão atinge o endotélio pode levar meses para fechamento da ferida e ainda resultar em opacificação permanente da córnea (KERN, 1994). No entanto, o grande problema das lesões na córnea é quando o processo de cicatrização normal é retardado ou simplesmente não ocorre, o que pode levar a prejuízos visuais temporários ou definitivos para o indivíduo, dependendo do grau de comprometimento tissular (SO et al., 2008).

2.2.3. *Diabetes mellitus* e as alterações na superfície ocular

O *Diabetes mellitus* (DM) tem sido associado, juntamente com o envelhecimento, como o principal fator de risco responsável pelo desenvolvimento de doenças no globo ocular (MOSS et al., 2000 + MOSS et al., 2004). Suas repercussões oftalmológicas são variadas e incluem desde as complicações mais conhecidas, como a retinopatia diabética e a catarata, até erros refracionais, glaucoma neovascular, paresias oculomotoras, defeitos epiteliais persistentes e a diminuição da sensibilidade corneana (AZAR et al., 1992; GOEBBELS, 2000). No entanto, nos últimos anos a sua relação com as lesões epiteliais da córnea e com os distúrbios no funcionamento das glândulas lacrimais tem sido muito discutido (RAMOS-REMUS et al., 1994; GOEBBELS, 2000; DOGRU et al., 2001; KAISERMAN et al., 2005).

Estudos verificaram que os pacientes diabéticos apresentam retardo no processo de cicatrização da córnea e que, frequentemente, queixam-se de sintomas típicos da síndrome do olho seco, como a queima e a sensação de corpo estranho

(DOGRU et al., 2001). Alguns autores apontam a hiperglicemia crônica (EBARA et al., 2000; GINSBERG et al., 2000), o estresse oxidativo causado por ela, as alterações nervosas e os distúrbios na sinalização da insulina, como as principais causas dessas alterações oculares (ISHIDA et al., 1984; ROCHA et al., 2000; PEPONIS et al., 2002; ALVES et al., 2005).

A hiperglicemia crônica, por exemplo, provoca anormalidades no fluxo de sangue e o aumento da permeabilidade vascular. O que, em conjunto, podem levar ao edema, isquemia, neovascularização e degeneração periférica dos nervos (ISHIDA et al., 1984; AZAR et al., 1992). No entanto, a principal consequência do desbalanço normoglicêmico é a indução dos produtos de glicação avançada, os conhecidos AGEs (do inglês, *Advanced Glycated End-products*), cuja formação e acúmulo nos tecidos oculares e na glândula lacrimal, durante o diabetes, reforçam o papel deste desbalanço nas complicações oftálmicas (BROWNLEE, 2001; ALVES et al., 2005).

Os AGEs são os responsáveis pela ativação da cascata intracelular de sinalização do NF- κ B, que promove a liberação de um grande número de genes, incluindo as citocinas pró-inflamatórias. Na glândula lacrimal, por exemplo, a expressão das citocinas do sistema imune inato, como o TNF- α e a IL-1 β , estão claramente envolvidas na insuficiência tecidual em modelos animais (ALVES et al., 2005; ALVES et al., 2008). Já na superfície ocular, o acúmulo dos AGEs alteram a adesão e a migração celular, levando aos defeitos epiteliais recorrentes e ao retardo da cicatrização de lesões na córnea (SADY et al., 1995; KAJI et al., 2000).

A hiperglicemia crônica também induz o estresse oxidativo, que exerce influência tanto na superfície ocular, como na glândula lacrimal. Sob estresse, as células endoteliais da córnea reagem aumentando o nível intracelular de cálcio e se proliferando, o que, em excesso, pode levar à fibrose tecidual e, conseqüentemente, a morte celular (KAJI et al., 2003; RIOS et al., 2005). Já na glândula, observam-se tanto alterações histológicas, quanto o acúmulo progressivo de grânulos de lipofuccina intracelular, produto insolúvel, não degradável pelas enzimas lisossomais, cujo excesso diminui a vida celular (RIOS et al., 2005; MODULO et al., 2009) e interfere na produção de fluido lacrimal pelas células acinares.

As alterações nervosas, observadas tanto no diabetes quanto no envelhecimento, também influenciam na fisiologia da superfície ocular e da glândula lacrimal (MATHERS et al., 1996). Em condições normais, o arco reflexo é a via nervosa responsável pelo movimento do fechamento completo e periódico das pálpebras durante o piscar. Este movimento que garante a distribuição homogênea da lágrima sob a superfície ocular e posterior drenagem para o sistema nasolacrimal, propiciando a estabilidade do filme lacrimal e a renovação de seus constituintes (TSUBOTA e NAKAMORI, 1995). No entanto, em decorrência do diabetes e do envelhecimento, observa-se falhas neste processo, com a consequente diminuição da motricidade palpebral e redução da secreção e distribuição do fluido na superfície ocular, o que diminui a sensibilidade corneana, leva ao ressecamento da córnea e o desenvolvimento de defeitos epiteliais de difícil cicatrização (HEIGLE e PFLUGFELDER, 1996).

Por último, diversos estudos têm relacionado os defeitos na sinalização da insulina, apresentados pelos pacientes diabéticos, com a prevalência da síndrome do olho seco (RAMOS-REMUS et al., 1994; GOEBBELS, 2000; ROCHA et al., 2000, ROCHA et al., 2002) e as dificuldades de regeneração da córnea (ISHIDA et al., 1984; SULLIVAN e HANN, 1989; ROCHA et al., 2000; ROCHA et al., 2002). Sabe-se que é justamente a redução e/ou ausência da insulina que desencadeia o desbalanço normoglicêmico e então provoca a hiperglicemia, com o potencial risco do desenvolvimento do ambiente inflamatório. No entanto, se por um lado a ausência de insulina desencadeia a hiperglicemia crônica e o dano tecidual, por outro a sua presença está relacionada à homeostase da córnea (MODULO et al., 2009).

A necessidade da suplementação com insulina de meios de cultura de células primárias da córnea e da glândula lacrimal foi um dos primeiros indícios da relação benéfica existente entre a presença da insulina e essas complicações oftálmicas (SCHULTZ et al., 1992). Anos depois, ainda *in vitro*, foi demonstrado que a exposição à insulina facilitava o fechamento de pequenas feridas em cultura de células epiteliais humanas, o que ocorria através do aumento da migração celular (SHANLEY et al., 2004).

No entanto, foi a confirmação da presença dos receptores e dos fatores de crescimento ligados a insulina (IGF-1R) na superfície ocular e na glândula lacrimal

(FINI, 1999; ROCHA et al., 2000; KLENKLER e SHEARDOWN, 2004), bem como a identificação deste hormônio tanto no filme, como na superfície ocular (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2005; ALVES et al., 2008; YU et al., 2010; ABDELKADER et al., 2011), associadas as características metabólicas e mitogênicas desempenhadas pela insulina em diversos tecidos alvos (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2007; ALVES et al., 2008), que reforçaram a sua ação local e apontaram para sua possível ação no combate e/ou retardo dessas alterações oculares.

De fato, a insulina tem sido alvo constante de pesquisas envolvendo a promoção da cicatrização de lesões na córnea (CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2006; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; WEI-LI, 2009; YU et al., 2010; BASTION e LING, 2013; HAMPEL et al., 2013) e, também, mostrou ser promissora na prevenção de lesões na glândula lacrimal, importante para o tratamento da SOS (MODULO et al., 2009).

2.3. Tratamento da síndrome do olho seco e das lesões na córnea

Apesar dos problemas relacionados à cicatrização de lesões na córnea serem considerados uma das alterações oculares de maior frequência mundial, representando a terceira maior causa de cegueira no mundo (TANDON et al., 2010), e da alta prevalência da SOS nos últimos anos (LIN et al., 2005; MILJANOVIC et al., 2007; DEWS, 2007; LEMP, 2008), não existe, atualmente, tratamento seguro e eficaz para a cicatrização da córnea (TANDON et al., 2010) e o tratamento para o olho seco é predominantemente sintomático (FONSECA et al., 2010).

Embora os corticosteróides tópicos sejam frequentemente empregados para a promoção da cicatrização de lesões na córnea, eles são benéficos apenas em curto prazo. Muitos causam efeitos colaterais e raramente são considerados eficazes na redução efetiva das lesões (PRICE et al., 2001). Vários outros agentes, tais como inibidores sintéticos de metaloproteinase, ciclosporina-A, vitamina E, diclofenaco, entre outros têm demonstrado algum benefício em estudos com animais. No entanto, sua alta toxicidade ocular combinada com outros efeitos colaterais deletérios limita a sua utilização em seres humanos (BILGIHAN et al., 2000; TANDON et al., 2010).

Já o tratamento da SOS, geralmente, envolve a administração de anti-inflamatórios ou secretagogos que atuam como paliativos, mas não resolvem o

problema (FONSECA et al., 2010). Algumas estratégias, como a instilação de lágrimas artificiais sem preservantes, oclusão de um ou dos dois pontos lacrimais, óculos de proteção, tarsorrafia provisória, transplante de limbo (nos casos de deficiência das células germinativas do limbo), lente de contato terapêutica, membrana amniótica ou associação de duas ou mais dessas opções são também usadas no tratamento da SOS (MALAVAZZI et al., 2005). As terapias mais convencionais utilizam lágrimas artificiais e lentes de contato terapêutica, no entanto, muitas vezes falham (ZAGON et al., 2007). Apesar de essas estratégias serem frequentemente utilizadas na prática clínica, muitas não possuem avaliações comparativas por estudos clínicos ou de longo prazo (FONSECA et al., 2010).

Desta forma, a ineficácia e em alguns casos, as complicações e toxicidades das práticas atuais utilizadas no tratamento de lesões na córnea e da SOS ilustram os riscos inerentes dos tratamentos disponíveis e a necessidade do desenvolvimento de terapias mais seguras (TANDON et al., 2010). Neste contexto, as recentes elucidações dos mecanismos envolvidos na hiperglicemia crônica, no estresse oxidativo e nos defeitos na sinalização da insulina, impulsionaram a pesquisa de tratamentos potenciais das alterações da superfície ocular e da SOS (PEPONIS et al., 2002; ALVES et al., 2005; ALVES et al., 2008).

Degenhardt et al. (2002), por exemplo, verificaram que os agentes anti-AGEs possuem um potencial efeito protetor contra a retinopatia diabética durante a hiperglicemia crônica. Já Peponis et al. (2004) comprovaram que a suplementação diária com vitamina C e E pode melhorar alguns parâmetros fisiológicos da superfície ocular em pacientes diabéticos, em resposta ao dano oxidativo. Yin et al. (1998) e Jorge et al. (2009) demonstraram a ação da aspirina, conhecida por contrapor complicações diabéticas e inibir a cascata de sinalização do NF- κ B, no tratamento de danos à superfície ocular e de lesões na glândula lacrimal. De forma semelhante, Beauregard e Brandt (2003) relataram que os agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo-gamma (PPAR γ) são úteis para melhorar a secreção da glândula lacrimal devido a inibição da produção de IL-1 β e de óxido nítrico. No entanto, nos últimos anos, o envolvimento da insulina na promoção da cicatrização da córnea (CUNHA et al., 2005; ZAGON et al., 2006; ZAGON et al., 2007; ALVES et al., 2008; WEI-LI, 2009; YU et al., 2010; HAMPEL et al., 2013; BASTION et al.,

2013) e como um possível aliado no tratamento da SOS (MODULO et al., 2009), tem merecido destaque.

Em 2006, Zagon et al. demonstraram *in vivo*, em ratos diabéticos, que a terapia intensiva com a insulina, necessária para restabelecer a normoglicemia dos animais, evitou os problemas de retardo e dificuldade de cicatrização do epitélio corneano. No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores chegou à conclusão de que a insulina aplicada topicamente é capaz de normalizar o processo de reepitelização da córnea em ratos diabéticos (ZAGON et al., 2007). Sob a coordenação de Wei-Li (2009), no hospital universitário de Taiwan, um estudo clínico randomizado em humanos, verificou que a utilização da insulina associada ao tratamento convencional favoreceu o fechamento de lesões na córnea após a cirurgia de *vitrectomia pars plana* (PPV) e o transplante de córnea. Resultado semelhante foi observado por Bastion et al. (2013), no qual a incorporação da insulina ao tratamento usual acelerou, em humanos, o fechamento das lesões após a cirurgia vítreo-retiniana.

Alguns estudos reforçam ainda mais a utilização da insulina tópica ocular. De acordo com Liu et al. (2009), por exemplo, o tratamento com a insulina, quando comparado com outros fatores de crescimento utilizados para promover o reparo de lesões na córnea, é o mais barato, mais prontamente disponível e o seu uso em humanos é aprovado pelo FDA. Bartlett et al. (1994b) demonstrou que os colírios contendo insulina eram confortáveis tanto para a córnea quanto para a conjuntiva, semelhantes inclusive a instilação de uma simples solução salina estéril, cuja segurança estava assegurada mesmo após a exposição multi-dose, quando veiculados na concentração de 100 UI/mL. Resultado também encontrado por Zagon et al. (2007), que demonstrou que a insulina administrada topicamente, em longo prazo, nos animais diabéticos, na concentração de até 100 UI/mL, em solução isotônica com cloreto de sódio, não apresenta toxicidade.

No entanto, se por um lado, os estudos envolvendo a ação da insulina na cicatrização de lesões na córnea estão bem avançados, a ação do hormônio na restauração da glândula lacrimal em pacientes diabéticos ainda é pouco conhecida. Até o momento, o único tratamento realizado *in vivo*, com ratos diabéticos, envolveu a administração subcutânea de baixas doses de insulina. Neste trabalho, o tratamento diário, com 1 UI/mL de insulina, além de induzir a mitose e proliferação

celular, relevantes para a promoção da cicatrização de lesões na córnea, foi capaz de retardar o surgimento de algumas modificações bioquímicas e estruturais presentes nas glândulas lacrimais dos animais tratados, quando comparados aos animais não tratados (MODULO et al., 2009).

2.4. Insulina - estrutura e aplicação ocular

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido (CHEATHAN e KAHN, 1995; NAVARRO et al., 1999). Produzida e secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas (CARVALHEIRA et al., 2002) ela é essencial para a manutenção da homeostase da glicose e, portanto, responsável pela disponibilidade dos substratos energéticos (CHEATHAN e KAHN, 1995; NAVARRO et al., 1999). Além disso, este hormônio está diretamente relacionado a outros eventos celulares, como a regulação do transporte de íons e aminoácidos, metabolismo dos lipídeos, síntese de glicogênio, proteínas e DNA. A insulina é, portanto, uma substância primordial para o armazenamento dos nutrientes absorvidos pela ingesta e para o crescimento e diferenciação celular (WHITE e KAHN, 1994; CHEATHAN e KAHN, 1995; NAVARRO et al., 1999).

Sua molécula é constituída por duas cadeias polipeptídicas, α e β , com respectivamente 21 e 30 aminoácidos, que se mantêm interligadas por duas pontes dissulfeto, nas posições A7 e B7; A20 e B19 (ZIB e RASKIN, 2006; VAREWIJCK e JANSSEN, 2012) (Figura 5).

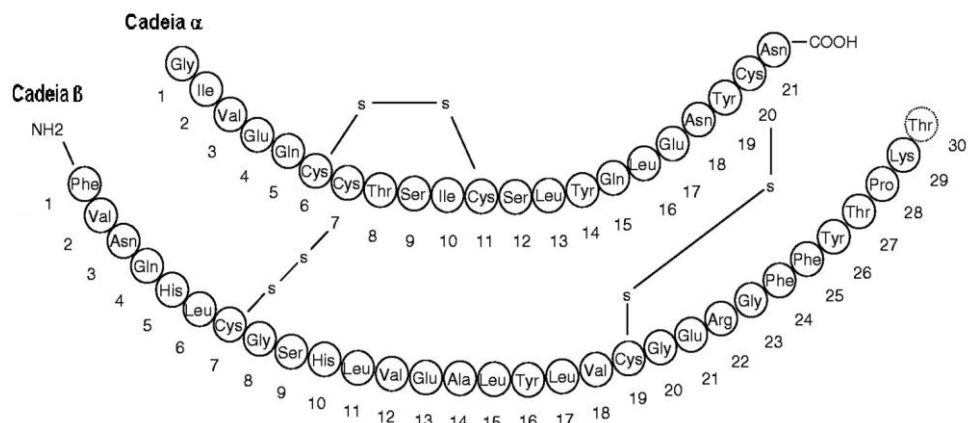


Figura 5: Representação esquemática da molécula de insulina (Adaptado de Varewijck e Janssen, 2012).

Dos 51 aminoácidos que constituem a molécula da insulina, seis apresentam carga positiva e dez, negativa, resultando em um residual de cargas negativo. Porém, sobre influência constante do pH. Seu ponto isoelétrico (pI) encontra-se entre 5,3 e 5,4 e, num intervalo de pH próximo ao seu pI, em meio aquoso, a insulina pode precipitar. A sua solubilidade depende, além do pH e do pI, da sua pureza, da natureza do solvente, da temperatura e da concentração de íons metálicos divalentes (BRANGE, 1987).

A insulina pura é muito estável. Em soluções com pH de 4 e temperatura de 2°C, pode manter-se estável durante anos. Alguns estudos demonstraram que a sua atividade biológica pode ser mantida durante dois anos quando armazenada a 0°C. No entanto, quando armazenada em temperatura de 20 a 25 °C, sua potência diminui em 20% logo após o primeiro ano. Em soluções fortemente alcalinas observa-se a quebra das pontes dissulfeto e, conseqüentemente, a degradação da insulina (BRANGE, 1987).

A luz compromete a estabilidade da insulina. Se por um lado, as radiações UV degradam os resíduos de cisteína, por outro a foto-oxidação conduz a degradação do grupo imidazol no resíduo de histidina, ambos com potencial perda da atividade biológica. A insulina também possui baixa estabilidade enzimática, sofrendo clivagem na presença das endopeptidases tripsina e α -quimiotripsina (CHIEN et al., 1996).

A atividade biológica da insulina é completamente dependente da manutenção de sua estrutura tridimensional, que por sua vez, é determinada pela presença das pontes dissulfeto intra e inter-cadeia de aminoácidos (CHIEN et al., 1996). Esse hormônio pode ser encontrado na forma de monômero, dímero ou hexâmero, que varia, principalmente, de acordo com a sua concentração no meio. Em baixas concentrações ($< 0,1 \mu\text{M}$) a molécula de insulina existe como um monômero, com diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 2,6 nm. Esta é a forma encontrada fisiologicamente na circulação sanguínea e a que assegura a sua ligação ao receptor transmembrana. Em concentrações superiores, a insulina dimeriza, tornando-se elipsoide. Em soluções neutras, ou ligeiramente ácidas (pH 4-8) e concentrações superiores a $2 \mu\text{M}$, pode ocorrer a associação de três dímeros, formando o hexâmero, com um forma esférica ligeiramente achatada e raio

hidrodinâmico de, aproximadamente, 5,6 nm (CHIEN et al., 1996). Dependendo da concentração, pH, íons metálicos e sais, pode haver, em solução, um equilíbrio entre monômeros, dímeros e hexâmeros (BRANGE, 1987) (Figura 6).

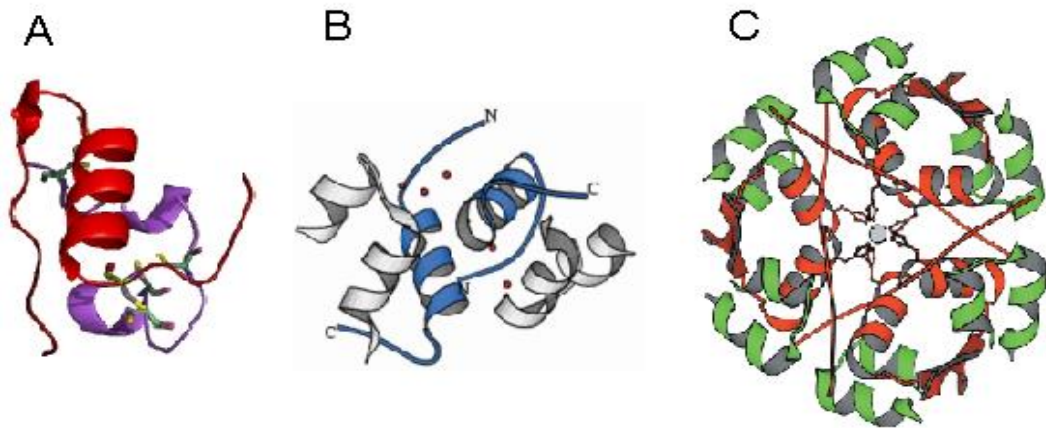


Figura 6: Estrutura tridimensional da molécula de insulina. A) monômero; B) dímero; C) hexâmero (Adaptado de Whittingham et al., 2006).

Existem diferentes tipos de insulina, as de origem animal, como a bovina e a suína, e as artificiais produzidas, por exemplo, por engenharia genética. Inicialmente, o tratamento dos pacientes diabéticos insulino-dependentes era realizado com insulinas de origem animal (POLONSKY, 2012). Apesar de existir uma grande semelhança entre essas insulinas, a composição dos seus aminoácidos varia um pouco. A insulina humana difere da suína em um único aminoácido, na posição B30, havendo a substituição de uma treonina (humana) para alanina (suína); enquanto a bovina difere em três, nas posições A8, A10 e B30, respectivamente treonina, isoleucina e treonina (humana) e alanina, valina e alanina (bovina). O peso molecular também é diferente, sendo 5,734 kDa na humana e, 5,703 e 5,747 kDa, na bovina e suína, respectivamente (NOITE e KARAM, 2005). Essas pequenas diferenças, associadas à rudimentariedade das primeiras técnicas de purificação da insulina, que deixavam pequenas quantidades de contaminantes, fizeram com que alguns pacientes apresentassem reações alérgicas e/ou desenvolvessem anticorpos com o intuito de neutralizá-las (DAVIS e GRANNER, 2005).

Atualmente, após o advento e desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante, a insulina humana recombinante, com estrutura idêntica ao hormônio humano, está amplamente disponível e, por isso, é a utilizada nestes pacientes,

proporcionando menos efeitos secundários. Vários estudos demonstraram que as insulinas recombinantes são quimicamente e funcionalmente semelhantes à insulina endógena (DAVIS e GRANNER, 2005).

A potência da insulina foi inicialmente estabelecida pela quantidade de hormônio necessário para reduzir o nível de açúcar no sangue de um coelho em 0,045% dentro de quatro horas (SINDING, 2002). Hoje, representada por unidade internacional (UI), um UI de insulina equivale a aproximadamente 3,5 mg de pó padrão dos cristais de insulina recombinante humano (BRYANT et al., 2007).

O efeito da insulina se inicia quando ela se liga a um receptor específico na membrana plasmática, pertencente a família dos receptores tirosina quinase. Esse receptor é formado por dois heterodímeros ligados de modo covalente, cada um contendo uma subunidade α que é totalmente extracelular e constitui o local de reconhecimento, e uma subunidade β que se estende pela membrana (KASUGA et al., 1982; NOITE e KARAM, 2005).

A ligação de uma molécula de insulina às subunidades α ativa o receptor e provoca uma alteração conformacional nas subunidades β citoplasmáticas opostas (NOITE e KARAM, 2005), que desencadeiam por sua vez uma cascata de sinalização intracelular, gerando o aumento de transportadores de glicose (GLUT 4), síntese de DNA, glicogênio e proteínas, influxo de nutrientes e armazenamento de energia. Esses eventos são essenciais para os efeitos metabólicos e mitogênicos desempenhados pela insulina sobre diversos tecidos alvos (ROCHA et al., 2002; CUNHA et al., 2007; ALVES et al., 2008). No entanto, além desses efeitos ou do papel da insulina no controle glicêmico, as suas vias de sinalização que regem a mitose e a proliferação celular, também têm sido associadas à manutenção da homeostase da córnea (MODULO et al., 2009) e estão diretamente relacionadas à preservação das características fenotípicas do epitélio corneano (ALVES et al., 2008). O que reforça a sua utilização para o tratamento tópico das lesões na córnea e, possivelmente, da SOS.

2.5. Administração ocular de fármacos

A administração tópica ocular de fármacos é, depois da pele, a via mais acessível, tanto vislumbrando a ação local, na superfície ocular, quanto nas camadas mais profundas do globo ocular. Porém, o maior problema deste tipo de

terapia tópica é a biodisponibilidade local do fármaco (KAUR e KANWAR, 2002). Sabe-se que a maior parte dos fármacos aplicados topicamente no olho é rapidamente drenada através de vários mecanismos, como a lacrimação, a diluição do fármaco pela lágrima e a renovação da lágrima, resultando em um curto tempo de permanência da formulação na superfície ocular, o que acarreta uma baixa biodisponibilidade local (KAUR e KANWAR, 2002; GHATE e EDELHAUSER, 2006; GUADANA et al., 2009).

Devido a estas perdas, as soluções oftálmicas contêm frequentemente altas concentrações do fármaco para manter a dosagem terapêutica no conteúdo lacrimal ou no sítio de ação. No entanto, o uso frequente de altas concentrações pode levar a efeitos tóxicos indesejáveis e danos às células da superfície ocular (URTTI e SALMINEN, 1993; HOLLANDER e ALDAVE, 2004), além de aumentar os custos com a produção. Uma alternativa que contrapõe a rápida eliminação do fármaco da superfície ocular é o aumento da frequência de instilação, visando manter a concentração terapêutica durante determinado período de tempo (OGURA, 2001). Porém essa prática, além de gerar incômodo, compromete a adesão medicamentosa (OLMEZ et al., 2005).

De fato, os trabalhos desenvolvidos até o momento utilizando a insulina para a cicatrização de lesões na córnea ou utilizaram aplicações invasivas, como implantes (ZAGON et al., 2006) ou soluções aquosas simples (ZAGON et al., 2007; WEI-LI et al., 2009; BASTION et al., 2013), o que repercutiu em elevada frequência de instilações e/ou no desenvolvimento de formulações contendo alta concentração do ativo.

Zagon et al. (2006), por exemplo, em seu primeiro trabalho, utilizou a aplicação de implantes subcutâneo de insulina, com liberação sustentada de duas unidades do fármaco por dia, durante 50 dias, suficiente para restabelecer a normoglicemia dos animais diabéticos e, portanto, evitar os problemas de retardo e dificuldade de cicatrização do epitélio corneano. No entanto, sabendo que o tratamento com implantes é considerado um método invasivo, no ano seguinte, Zagon et al. (2007) veiculou a insulina em uma solução aquosa simples, destinada a aplicação tópica, localizada e não invasiva. Porém foi necessário o tratamento diário, quatro vezes ao dia, durante sete dias, com 1 UI/mL de insulina, para normalizar a reepitelização da córnea em ratos diabéticos, uma frequência de instilação elevada.

Em 2009, o estudo clínico randomizado realizado por Wei-Li et al. (2009), também com a utilização de solução aquosa simples de insulina, contou tanto com uma grande frequência de instilação, quanto com o emprego de uma formulação contendo alta concentração do ativo. Neste caso, os pacientes do grupo experimental receberam após a cirurgia de *vitrectomia pars plana* (PPV) e o transplante de córnea e anterior ao tratamento medicamentoso usual, a terapia com a insulina na concentração de 100 UI/mL, a cada duas horas. Mais recentemente, durante os estudos realizados por Bastion et al., (2013), o fechamento de lesões na córnea só foi obtido com a instilação de uma solução aquosa de insulina com concentração de 50 UI/mL, quatro vezes ao dia, até o fechamento da ferida.

Desta forma, existem atualmente diversos estudos que reforçam a ação da insulina na cicatrização de lesões na córnea, além das vantagens associadas à utilização tópica deste hormônio em relação aos tratamentos usuais, tais como: o custo-eficácia; o aumento da adesão do paciente, por se tratar de um método não invasivo; a facilidade de aplicação; a independência do efeito sistêmico sobre o nível de glicose sérica; a prevenção do metabolismo de primeira passagem; mínimo de reações imunológicas; ausência de tolerância e efeitos adversos (ZAGON et al., 2007). No entanto, até o momento, só foram utilizadas formulações simples, soluções aquosas contendo o fármaco, o que acarreta elevada frequência de instilações e/ou o desenvolvimento de formulações com alta concentração de insulina.

Já para a SOS, os estudos envolvendo a ação da insulina com potencial terapêutico são mais escassos. O único estudo *in vivo* realizado com animais diabéticos envolveu a utilização de dosagens subcutâneas de 1 UI/mL de insulina, diariamente, dois dias após a indução da DM. A estratégia mostrou-se promissora para retardar o surgimento de alterações bioquímicas e estruturais (MODULO et al., 2009), no entanto não foi investigada a ação do hormônio quando a síndrome já estava instalada. Além disso, a via de administração foi invasiva, não localizada, pouco conveniente para os pacientes, além de causar dor, ferimentos e fobia de agulhas.

Assim, apesar de promissor, não foram encontrados na literatura formulações elaboradas ou sistemas de liberação contendo a insulina visando à administração ocular tópica. Sabe-se que a biodisponibilidade local do fármaco pode ser bastante

melhorada com o desenvolvimento de sistemas de liberação que possibilitem o aumento do tempo de residência desta macromolécula na superfície do olho, favorecendo tanto a sua maior penetração nas células da córnea, essencial para a cicatrização de lesões, quanto nas glândulas lacrimais, direcionada para a síndrome do olho seco. Desta forma, no presente trabalho foram desenvolvidas tanto formulações simples, quanto sistemas de liberação, para a veiculação ocular tópica da insulina.

2.5.1. Micropartículas

Sistemas de liberação microparticulados são bastante promissores para a administração de fármacos na córnea (KOMPELLA et al., 2003; AYALASOMAYAJULA e KOMPELLA, 2005; LIU et al., 2008; GUADANA et al., 2009). A incorporação de fármacos em sistemas dispersos de menor diâmetro oferece várias vantagens para a aplicação tópica ocular como, por exemplo: ausência de efeitos que atrapalhem a visão, aumento no tempo de residência do ativo na superfície ocular e nos tecidos intra-oculares e liberação prolongada do fármaco na córnea (PIGNATELLO et al., 2002; VANDERVOORT; LUDWIG, 2007; LIU et al., 2008).

Com diâmetro entre 1-1000 μm (GUADANA et al., 2009) as micropartículas, quando aplicadas topicamente, não comprometem a visão, o que está diretamente relacionado a dimensão das partículas empregadas. Neste contexto, de acordo com Hsu (2007), as micropartículas são mais vantajosas que as nanopartículas, uma vez que as últimas permanecem suspensas na cavidade vítrea e, por isso, frequentemente são associadas ao embaçamento da visão, enquanto que as micropartículas se sedimentam e não comprometem a transparência do humor vítreo (DEL AMO et al., 2008).

Quando comparado aos colírios convencionais, que são rapidamente drenados, as micropartículas podem aumentar o tempo de residência do fármaco encapsulado tanto na superfície ocular, como nas estruturas internas. (PIGNATELLO et al., 2002). Além disso, diversos estudos têm associado esses sistemas à liberação prolongada de fármacos na córnea (KOMPELLA et al., 2003; SAINSHIN et al., 2003; AYALASOMAYAJULA; KOMPELLA, 2005). Essas características favorecem não só uma maior biodisponibilidade local, mas também a

redução da frequência de instilação (VANDERVOORT; LUDWIG, 2007) e o desenvolvimento de formulações contendo menor concentração do fármaco. Menores concentrações de fármaco na formulação podem favorecer a minimização dos efeitos tóxicos sistêmicos ou locais em comparação aos sistemas convencionais que utilizam altas concentrações de fármacos (PIGNATELLO et al., 2002; LIU et al., 2008).

Além dessas características, as micropartículas podem fornecer ao fármaco proteção tanto enzimática (VANDERVOORT; LUDWIG, 2007), quanto da degradação física, química ou biológica (DATE et al., 2007), particularmente importante em nosso estudo. Além de possibilitar, quando necessário, a eliminação de incompatibilidades entre dois ou mais ativos e, no caso de fármacos administrados por via oral, o mascaramento do sabor desagradável (AHMAD et al., 2011; THOMPSON et al., 2007).

Após a administração tópica ocular, a liberação do fármaco da micropartícula pode ser iniciada tanto pela degradação ou erosão da partícula, quando são utilizados polímeros biodegradáveis, quanto pela difusão através da matriz, quando se tratam de polímeros inertes (PIGNATELLO et al., 2002). Para a administração tópica ocular, destaca-se a utilização de polímeros biodegradáveis, sendo a quitosana um dos mais estudados (RODRIGUES et al., 2009; GRATIERI et al., 2010).

De origem natural, a quitosana é um polímero facilmente obtido através da desacetilação da quitina, componente estrutural da casca de crustáceos, cutícula de insetos e da parede de alguns fungos e microrganismos (KAO et al., 2006; SHAH et al., 2008). Além de biodegradável e biocompatível, a quitosana é hidrofílica (SHAH et al., 2008), apresenta excelente compatibilidade com a superfície do olho e seu uso é aprovado pelo FDA (RODRIGUES et al., 2009). Para a administração tópica ocular de fármacos na córnea, duas características apresentadas pela quitosana merecem especial atenção: a presença de grupamentos amina (MAKHLOF et al., 2008) e suas características de promotora de absorção (DI COLO et al., 2008).

Na estrutura química da quitosana (Figura 7) estão presentes grupamentos amina carregados positivamente que podem interagir com os resíduos negativos da camada de muco, presente na superfície ocular, conferindo propriedades mucoadesivas (MAKHLOF et al., 2008), o que favorece o aumento do tempo de

contato do ativo com a superfície ocular. Por outro lado, as cargas positivas podem provocar uma reorganização estrutural das proteínas presentes nas membranas celulares, o que favorece a permeação do fármaco pela rota intracelular (SCHIPPER et al., 1997). De acordo com Dodane et al. (1999), a quitosana atua como promotora de absorção tanto pela rota intracelular, quanto pela rota intercelular, o que ocorre de maneira reversível e sem afetar a viabilidade celular.

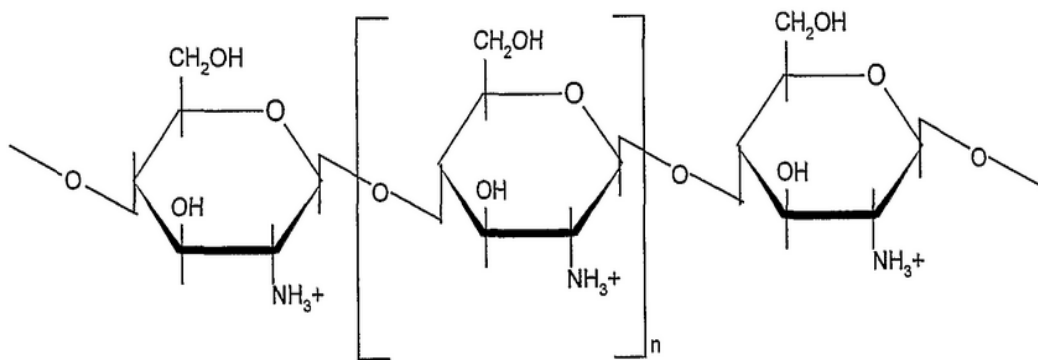


Figura 7: Estrutura química da quitosana em baixo pH (Adaptado de Selimot et al., 2013).

Atualmente, estão descritos na literatura diversos métodos para a preparação das micropartículas, dentre eles o *spray drying* (STHAL et al., 2002; DEPRETER e OWENS et al., 2006; GELFUSO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009). Esta técnica é muito utilizada na área farmacêutica destacando-se pela encapsulação, formação de complexos e polimerização em um passo único e simples, trazendo como vantagens a rapidez no processo (GENC et al., 2006), a possibilidade de modular características físico-químicas dos pós resultantes, além da flexibilidade e do potencial de transposição de escala e do baixo custo (TEWA-TAGNE et al., 2007).

Micropartículas de insulina são preparadas há alguns anos com sucesso através da técnica do *spray drying* (STHAL et al., 2002; DEPRETER e OWENS et al., 2006; MALTESEN et al., 2008; AMIGHI, 2010; SANDRZADEH et al., 2010; BOWEY et al., 2012). De acordo com alguns autores, a temperatura do ar de saída da câmara de secagem é o ponto crítico para garantir a estabilidade do fármaco ao término da produção (STHAL et al., 2002; SANTOS et al., 2003; SANDRZADEH et al., 2010). Temperatura essa que deve ser mantida inferior a 120°C, com o intuito de

evitar o processo de degradação da insulina e, conseqüentemente, a formação de seus produtos de degradação (STHAL et al., 2002).

Apesar de existirem na literatura diversos estudos com formulações de nano/micropartículas de insulina para administração oral (SOCHA et al., 2009; COZAR-BERNAL et al., 2011) e pulmonar (DEPRETER et al., 2012) com comprovada permanência da sua atividade mesmo após a encapsulação, não existem relatos, até o momento, da produção de micropartículas de insulina para o tratamento tópico de lesões oculares e/ou para a síndrome do olho seco.

2.5.2. Gel termorreversível

Atualmente, com o intuito de contrapor as limitações relacionadas ao uso dos colírios aquosos convencionais, têm sido desenvolvidos sistemas de liberação que aumentem o tempo de residência do fármaco na superfície ocular, o que é obtido, por exemplo, com a utilização de pomadas e géis (LEE et al., 1986; GRATIERI et al., 2010; ABELHA et al., 2012). Entretanto, estes sistemas apresentam algumas desvantagens que limitam a adesão dos pacientes ao tratamento. As pomadas, por exemplo, são oleosas, “embaçam” a visão e são de difícil aplicação. Alguns autores relatam que, assim como as pomadas, os géis também são difíceis de serem administrados (EDSMAN et al., 1998; SIMAMORA et al., 1998).

Neste contexto, o desenvolvimento dos géis termorreversíveis *in situ* pode ser uma estratégia para favorecer a terapêutica, pois são de fácil administração e possibilitam uma cobertura rápida e completa da superfície ocular (LE BOURLAIS et al., 1998). Em temperatura ambiente esses hidrogéis encontram-se na fase líquida, como colírios usuais, e ao entrar em contato com o olho se geleificam devido a alterações físico-químicas (NANJAWADE et al., 2007; YIN et al., 2010). Essa transição para a forma de gel pode acarretar aumento do tempo de retenção da formulação na superfície do olho e, conseqüentemente, do fármaco, já que aumenta a força mecânica e reduz a perda pela drenagem lacrimal (KIM et al., 2002; GRATIERI et al., 2010).

Além disso, os géis termorreversíveis podem atuar como sistemas de liberação. Constituídos por polímeros hidrofílicos com capacidade de absorver grande quantidade de água e intumescer, no entanto, sem alterar a sua estrutura tridimensional, os hidrogéis permitem a difusão de substâncias pra dentro e pra fora

de sua estrutura, o que possibilita a sua utilização como sistema de liberação de fármacos (ANUMOLU et al., 2009; YIN et al., 2010). Por constituírem sistemas de liberação, propiciam tanto a redução da frequência de instilação, o que favorece a adesão dos pacientes ao tratamento, quanto o desenvolvimento de formulações com menor quantidade de ativo, reduzindo assim a toxicidade ocular (PIGNATELLO et al., 2002; LIU et al., 2008) e os gastos com a produção. De acordo com Le Bourlais et al. (1998), os géis termorreversíveis *in situ* propiciam, ainda, dosagens exatas e reprodutíveis.

Para o desenvolvimento de formulações tópicas termorreversíveis destinadas à aplicação ocular, tem sido utilizado com frequência o poloxamer 407 (WEI et al., 2002; MAYO et al., 2008; GRATIERI et al., 2010), tensoativo sintético, não tóxico, anfifílico e não iônico (WEI et al., 2002). Este polímero forma micelas em solução aquosa que podem formar um gel viscoso, dependendo da temperatura e da concentração do polímero empregada (JUHASZ et al., 1989). No entanto, a principal desvantagem do gel constituído por poloxamer é a baixa força mecânica, o que leva à rápida erosão (EL KAMEL et al., 2002). Desta forma, com o intuito de contornar esse problema, a associação com outros polímeros tem sido muito utilizada (LIN et al., 2004; QI et al., 2007).

Neste sentido, em 2010 foi desenvolvido e caracterizado com sucesso, em nosso laboratório, um gel polimérico binário, constituído por poloxamer 407 e quitosana para a veiculação ocular de fluconazol. Este sistema apresentou um maior tempo de residência na córnea, *in vivo*, quando comparado a uma solução isotônica comum (colírio), além de temperatura de geleificação adequada, propriedades mucoadesivas favoráveis e melhores parâmetros mecânicos (GRATIERI et al., 2010). O que nos fez pensar também na utilização deste sistema para a veiculação da insulina tópica ocular, direcionada tanto para o tratamento de SOS, como das lesões na córnea.

3. CONCLUSÕES

- As micropartículas de quitosana/insulina, obtidas por *spray drying*, apresentaram elevada quantidade de insulina ativa no pó aspergido, além de tamanho, morfologia e potencial zeta adequados para a administração tópica ocular;

- O gel termorreversível *in situ* de quitosana 1% e poloxamer 407 16% contendo insulina apresentou osmolalidade e pH compatíveis para a veiculação ocular, além de potencial zeta positivo;

- Foi possível incorporar as micropartículas de quitosana/insulina ao gel termorreversível *in situ*, constituindo, assim uma formulação com dois sistemas de liberação;

- A indução do *diabetes mellitus* por estreptozotocina foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de fluido lacrimal produzida pelos animais doentes, em relação aos animais saudáveis;

- O estudo *in vivo* com as formulações contendo insulina indicou aumento da quantidade de fluido lacrimal, sendo que os animais tratados com a dispersão contendo insulina e com o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas quitosana/insulina apresentaram a mesma quantidade de fluido lacrimal que os animais saudáveis;

- Foi possível detectar a presença da insulina proveniente das formulações nas glândulas lacrimais e no globo ocular dos animais tratados topicamente, sendo que o sistema contendo o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas quitosana/insulina foi o que apresentou melhor desempenho;

- O tratamento tópico com as formulações contendo insulina foi capaz de reduzir a glicemia capilar dos animais após duas horas do tratamento, o que pode ser importante como uma terapia complementar em pacientes diabéticos já em uso de insulinas ou fármacos orais secretagogos;

- As análises da citologia de impressão da córnea mostraram que as células do epitélio dos animais tratados com a dispersão contendo as micropartículas quitosana/insulina e com o gel termorreversível *in situ* contendo a insulina livre e contendo a insulina encapsulada apresentaram-se em número e relação núcleo/citoplasma semelhantes as células dos animais saudáveis;

- As análises histológicas mostraram que a espessura do epitélio da córnea dos animais tratados com o gel termorreversível *in situ* com insulina e com micropartícula quitosana/insulina foi a que mais se assemelhou a dos animais saudáveis, sem diferença estatística;

- Associando os resultados de produção de fluido lacrimal, citologia de impressão e espessura do epitélio da córnea, além da recuperação da insulina na

glândula lacrimal e no globo ocular, a formulação mais indicada para o tratamento da síndrome do olho seco e lesões na córnea é o gel termorreversível *in situ* contendo as micropartículas quitosana/insulina.

4. REFERÊNCIAS

ABDELKADER, H.; PATEL, D. V.; MCGHEE, C. N. J.; ALANY, R. G. New therapeutic approaches in the treatment of diabetic keratopathy: a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 39, n.3, p. 259-270, 2011.

ABELHA, T.F.; VICENTINI, F.T.M.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Osmolality determination of poloxamer 407 thermosetting gels for ocular delivery. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n.1, p., 2012.

AGRAWAL, V.B.; TSAI, R.J. Corneal epithelial wound healing. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 51, n. 1, p. 5-15, 2003.

AHMAD, M.; MANDI, A.; USMAN, M.; MUNIR, A.; AKHTAR, N.; KHAN, H.M.S. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 75, p. 384-7, 2011.

ALVES, M.; CALEGARI, V. C.; CUNHA, D. A.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A.; ROCHA, E. M. Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor, and activation of nuclear factor kappa- β in lacrimal glands of diabetic rats. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2675-81, 2005.

ALVES, M.C.; CARVALHEIRA, J. B.; MODULO, C. M.; ROCHA, E. M. Tear film and ocular surface changes in *diabetes mellitus*. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 71, n. 6, p. 96-103, 2008.

ANUMOLU, S.S.; SINGH, Y.; GAO, D.; STEIN, S.; SINKO, P.J. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogels for sustained pharmacological response. **Journal of Control Release**, v. 137, n. 2, p. 152-9, 2009.

AYALASOMAYAJULA, S.P.; KOMPELLA, U.B. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles retinal drug levels and alleviate diabetes- induced oxidative stress in a rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 511, n. 2-3, p. 191- 198, 2005.

AZAR, D.T.; SPURR-MICHAUD, S.J.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. **Archives of Ophthalmology**, v. 110, n. 4, p. 537-40, 1992.

BAEYENS, V.; GURNY, R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, n. 4, p. 191-202, 1997.

BANDEEN-ROCHE, K.; MUNOZ, B.; TIELSCH, J.M.; WEST, S.K.; SCHEIN, O.D. Self-reported assessment of dry eye in a population-based setting. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 12, p. 2469-75, 1997.

BARTLETT, J.D.; TURNER-HENSEN, A.; ATCHISON, J.A.; WOOLLEY, T.W.; PILLION, D.J. Insulin administration to the eyes of normoglycemic human volunteers. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 683-90, 1994a.

BARTLETT, J.D.; TURNER-HENSEN, A.; ATCHISON, J.A.; WOOLLEY, T.W.; PILLION, D.J. Toxicity of insulin administration chronically to human eye *in vivo*. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 101-7, 1994b.

BASTION, M.L.; LING, K.P. Topical insulin for healing of diabetic epithelial defects?: A retrospective review of corneal debridement during vitreoretinal surgery in Malaysian patients. **The Medical Journal of Malaysia**, v. 68, n. 3, p. 208-16, 2013.

BEAUREGARD, C.; BRANDT, P. C. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists inhibit interleukin-1 beta-mediated nitric oxide production in cultured lacrimal gland acinar cells. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.19, n. 6, p. 579-87, 2003.

BERDAL, M.; APPELBOM, H. I.; EIKREM, J. H.; LUND, A.; BUSUND, L-T.; HANES, R.; SELJELID, R.; JENSSEN, T. Aminated β -1,3-D-glucan has a dose-dependent effect on wound healing in diabetic db/db mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 5, p. 579-87, 2011.

BILGIHAN, K.; OZDEK, S.; OZOGUL, C.; GURELIK, G.; BILGIHAN, A.; HASANREISOGLU, B. Topical vitamin E and hydrocortisone acetate treatment after photorefractive keratectomy. **Eye**, v. 14, p. 231-7, 2000.

BIN CHOY, Y.; PARK, J.H.; PRAUSNITZ, M.R. Mucoadhesive microparticles engineered for ophthalmic drug delivery. **The Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 69, n. 5-6, p. 1533-6, 2008.

BIOHULIN® - Insulina Humana Regular. Responsável técnico Marco Aurélio de L. Xavier. Montes Claros: Biobrás S.A, 2012. Bula de remédio.

BOWEY, K.; SWIFT, B. E.; FLYNN, L. E.; NEUFELD, R. J. Characterization of biologically active insulin-loaded alginate microparticles prepared by *spray drying*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 3, p. 457-65, 2013.

BOWMAN, L.M.; SI, E.; PANG, J.; ARCHIBALD, R.; FRIEDLAENDER, M. Development of a topical polymeric mucoadhesive ocular delivery system for azithromycin. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 133-139, 2009.

BRYANT, B.J.; KNIGHTS, K.; SALERNO, E. **Pharmacology for health professionals**. 2nd ed. Marrickville, N.S.W.: Elsevier, 2007, p. 1040.

BRANGE, J. **Galenics of insulin: the physic-chemical and pharmaceutical aspects of insulin and insulin preparations**. 1 ed. Springer-Verlag, Berlim, Heidelberg. 103 p. 1987.

BREWITT, H.; SISTANI, F. Dry eye disease. The scale of the problem. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, Suppl. 2, p. 199-202, 2001.

BROWN, K.E.; CONGDON, N.G. Corneal structure and biomechanics: impact on the diagnosis and management of glaucoma. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 17, n. 4, p. 338-343, 2006.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, 2001.

CARVALHEIRA, J.B.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.46, n.4, p.419-425, 2002.

CEVHER, R.; ORHAN, Z.; MÜLAZIMOĞLU, L.; SENSOY, D.; ALPER, M.; YILDIZ, A.; OZSOY, Y. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing

vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, n. 2, p. 127-35, 2006.

CHAUNDHURY, A.; DAS, S. Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. **AAPS PharmaSciTech**, v. 12, n. 1, p. 10-20, 2010.

CHEATHAM, B.; KAHN, R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 2, p. 117-41, 1995.

CHIEN, H.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Polymerized liposomes as potential oral vaccine carrier: stability and bioavailability. **Journal of Control Release**, v. 42, n. 3, p. 263-72, 1996.

CHRISTIE, C.D.; HANZAL, R.F. Insulin absorption by the conjunctival membranes in rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, v. 10, n. 4, p. 787-93, 1931.

CREECH, J.L.; DO, L.T.; FATT, I.; RADKE, C.J. *In vivo* tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. **Current Eye Research**, v. 17, n. 11, p. 1058-66, 1998.

CROSSON, C.E.; KLYCE, S.D.; BEUERMAN, R.W. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 27, n. 4, p. 464-73, 1986.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

COZAR-BERNAL, M. J.; HOLGADO, M. A.; ARIAS, J. L.; MUNOZ-RUBIO, I.; MARTIN-BANDERAS, L.; ALVAREZ-FUENTES, J.; FERNANDEZ-AREVALO, M. Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing *versus* Double emulsion/solvent evaporation. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n.5, p. 430-41, 2011.

CUI, X.; HONG, J.; WANG, F.; YANG, Y.; XU, J.J. Assessment of corneal epithelial thickness in dry eye patients evaluated by Fourier-domain optical coherence tomography. In: **ARVO 2014 – Annual Meeting Abstracts, 506 – Corneal Epithelium and Development**, 2014. Disponível em: <<http://www.arvo.org/webs/am2014/abstract/sessions/506.pdf>>. Acesso em: 19 de junho de 2014.

CUNHA, D.A.; CARNEIRO, E.M.; ALVES, M.C.; JORGE, A.G.; SOUSA, S.M.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. A.; VELLOSO, L.A.; ROCHA, E.M. Insulin secretion by rat lachrymal glands: effects of systemic and local variables. **American Journal of Psysiology Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 5, p. 768-75, 2005.

CUNHA, D.A.; ALVES, M.C.; STOPPIGLIA, L.F.; JORGE, A.G.; MODULO, C.M.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A.; ROCHA, E.M. Extra-pancreatic insulin production in rat lachrymal gland after streptozotocin-induced islet β -cells destruction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, n.8, p. 1128-35, 2007.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPIRITO-SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DANIELS, J.T.; DART, J.K.; TUFT, S.J.; KHAW, P.T. Corneal stem cells in review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 6, p. 483-94, 2001.

DART, J. Impression cytology of the ocular surface – research tool or routine clinical investigation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 81, n. 11, p. 930, 1997.

DATE, A.A.; JOSHI, M.D.; PATRAVALE, V.B. Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles *versus* lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 505-21, 2007.

DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The tear film and ocular mucins (Review). **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n. 2, p. 71-7, 2004.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. **Insulina, Hipoglicemiantes Orais e a Farmacologia do Pâncreas Endócrino**. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cap. 61, p. 1263-1290, 2005.

DEGENHARDT, T.P.; ALDERSON, N.L.; ARRINGTON, D.D.; BEATTIE, R.J.; BASGEN, J.M.; STEFFES, M.W.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. **Kidney International**, v. 61, n.3, p. 939-50, 2002.

DEL AMO, E.M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3-4, p. 135-43, 2008.

DELFINO, V.D.A.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.J. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DEPRETER, F.; AMIGHI, K. Formulation and *in vitro* evaluation of highly dispersive insulin dry powder formulations for lung administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 454-63, 2010.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by *spray drying*: effect of cross-linking agent on the properties of *spray dried* microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 4, p. 377-95, 2005.

DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; ZAINO, C. Polymeric enhancers of mucosal epithelia permeability: synthesis, transepithelial penetration-enhancing properties, mechanism of action, safety issues. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 97, n. 5, p. 1652-80, 2008.

DODANE, V.; KHAN, M.A.; MERWIN, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, n. 1, p. 21-32, 1999.

DOGRU, M.; KATAKAMI, C.; INOUE, M. Tear function and ocular surface changes in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Ophthalmology**, v. 108, n. 3, p. 586-92, 2001.

Dry Eye Workshop (DEWS) Committee. Report of the Dry Eye Workshop (DEWS). **The Ocular Surface**, v. 5, n. 2, p.65-204, 2007.

DUA, H.S.; GOMES, J.A.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **British Journal of Ophthalmology**, v. 78, n. 5, p. 401-8, 1994.

EBARA, T.; CONDE, K.; KAKO, Y.; LIU, Y.; XU, Y.; RAMAKRISHNAN, R.; GOLDBERG, I.J.; SHACHTER, N.S. Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. **The Journal Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1807-18, 2000.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETTERSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an *in situ* gel for ophthalmic use. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 105-112, 1998.

EL KAMEL, A.; SOKAR, M.; NAGGAR, V.; AL GAMAL, S. Chitosan and sodium alginate-based bioadhesive vaginal tablets. **AAPS PharmSci**, v. 4, n. 4, p. E44, 2002.

ELSAYED, A.; AL-REMAWI, M.; FAROUK, A.; BADWAN, A. Insulin-chitosan polyelectrolyte nanocomplexes: preparation, characterization and stabilization of insulin. **Sudan Journal of Medical Science**, v. 5, p. 99-110, 2010.

ETHIER, C.R.; JOHNSON, M.; RUBERTI, J. Ocular biomechanics and biotransport. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, p. 249-73, 2004.

EVANS, M.D.; McFARLAND, G.A.; TAYLOR, S.; WALBOOMERS, X.F. The response of healing corneal epithelium to grooved polymer surfaces. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1703-11, 2005.

FARRIS, R.L.; STUCHELL, R.N.; MANDEL, I.D. Tear osmolarity variation in the dry eye. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 84, p. 250-68, 1986.

FILENIUS, S.; TERVO, T.; VIRTANEN, I. Production of fibronectin and tenascin isoforms and their role in the adhesion of human immortalized corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3317-25, 2003.

FINI, M.E. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 18, n. 4, p. 529-51, 1999.

FONSECA, E.C.; ARRUDA, G.V.; ROCHA, E.M. Dry eye: etiopathogenesis and treatment. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2010.

FOSTER, A.; RESNIKOFF, S. The impact of vision 2020 on global blindness. **Eye**, v. 19, n. 10, p. 1133-5, 2005.

FRANZEN, A.A.; PIGATTO, J.A.; ABIB, F.C.; ALBUQUERQUE, L.; LAUS, J.L. Use of specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cat eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 4, p. 222-6, 2010.

GAYTON, J.L. Etiology, prevalence and treatment of dry eye disease. **Clinical Ophthalmology**, v. 3, p. 405-12, 2009.

GELFUSO, G.M.; GRATIERI, T.; SIMAO, P.S.; FREITAS, L.A.P.; LOPEZ, R.F.V. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p.650-658, 2011.

GENC, L.; DEMIREL, M.; YAZAN, Y. Preparation of prolonged release clarithromycin microparticles for oral use and their *in vitro* evaluation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n.10, p. 921-7, 2006.

GEORGIEV, D. Photons do collapse in the retina not in the brain cortex: evidence from visual illusions. **NeuroQuantology**, v. 9, n. 2, p. 206-30, 2011.

GILBARD, D.J.P.; ROSSI, S.R.; GRAY, K.L. A new rabbit model keratoconjunctivitis sicca. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, n. 2, p. 225-8, 1987.

GINSBERG, H.N. Insulin resistance and cardiovascular disease. **Journal Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 453-8, 2000.

GIPSON, I.K.; WESTCOTT, M.J.; BROOKSBY, N.G. Effects of cytochalasins B and D and colchicine on the migration of corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 22, n. 5, p. 633-642, 1982.

GHATE, D.; EDELHAUSER, H.F. Ocular drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 2, p. 275-87, 2006.

GOEBBELS, M. Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics. **British Journal of Ophthalmology**, v. 84, n. 1, p. 19-21, 2000.

GOMES, J.A.P. Update of the treatment of cicatricial keratoconjunctivitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 1, p. 91-96, 2000.

GRASS, G.M.; ROBINSON, J.R. Mechanisms of corneal drug penetration. II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 77, n. 1, p. 15-23, 1988.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; FREITAS, O.; ROCHA, E.M.; LOPEZ, R.F.V. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan *in situ* forming gel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 320-327, 2011.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; ROCHA, E. M.; SARMENTO, V. H.; FREITAS, O.; LOPEZ, R. F. V. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186-93, 2010.

GREAVES, J.L.; WILSON, C.G. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, n. 3, p. 349-83, 1993.

GRIBANOV, A.V.; SAZANOV, Y.N. Polyacrylonitrile: carbonization problems. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 81, n. 6, p. 919-32, 2008.

GUADANA, R.; JWALA, J.; BODDU, S.H.; MITRA, A.K. Recent perspectives in ocular drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1197-1216, 2009.

HALLSCHMID, M.; BENEDICT, C.; SCHULTES, B.; FEHM, H-L.; BORN, J.; KERN, W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 3024-9, 2004.

HAMANO, H.; HORI, M.; MITSUNAGA, S.; KOJIMA, S.; MAESHIMA, J. Tear test (preliminary report). **Journal of the British Contact Lens Association**, v. 24, p. 103-7, 1982.

HAMPEL, U.; KLONISCH, T.; SEL, S.; SCHULZE, U.; GARREIS, F.; SEITMANN, H.; ZOUBOULIS, C.C.; PAULSEN, F.P. Insulin like factor 3 promotes wound healing at the ocular surface. **Endocrinology**, v. 154, n. 6, p. 2034-45, 2013.

HANNA, C.; O'BRIEN, J.E.; Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. **Achieves of Ophthalmology**, v. 64, p. 536-9, 1960.

HAO, J.; LI, S.K.; KAO, W.Y.; LIU, C.Y. Gene delivery to cornea. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2-3, p. 256-61, 2010.

HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V.J. Effect of age, gender, weight and time of day on tear production In normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 1, p. 53-57, 2006.

HASHEMI, H.; MEHRAVARAN, S. Central corneal thickness measurement with Pentacam, Orbscan, and ultrasound devices before and after laser refractive surgery for myopia. **Journal of Cataract Refract Surgery**, v. 33, n. 10, p. 1701-7, 2007.

HEIGLE, T.J.; PFLUGFELDER, S.C. Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. **Cornea**, v.15, n. 2, p. 135-8, 1996.

HIDA, R.Y.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; HIDA, M.M.; TSUBOTA, K. Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, n. 4, p. 433-37, 2005.

HINCAPIEA, D.; KREUZERB, H.J.; GARCIA-SUCERQUIA, J. Zeta potential measurement with digital in-line holographic microscopy. **Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2010.

HOEMANN, C.D.; CHENITE, A.; SUN, J.; HURTIG, M.; SERREGI, A.; LU, Z.; ROSSOMACHA, E.; BUSCHMANN, M.D. Cytocompatible gel formation of chitosan-glycerol phosphate solutions supplemented with hydroxyl ethyl cellulose is due to the presence of glyoxal. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 83, n. 2, p. 521-9, 2007.

HOFFMAN, A.; OWNBY, C.; LEHENBAUER, T.W.; SAMUELSON, D.; GILMOUR, M.; BARTELS, K. Light and electron microscopic evaluation of canine corneal endothelium following CO₂ photokeratotomy. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, Suppl: 1, p. 28-34, 2009.

HOLLANDER, D.A.; ALDAVE, A.J. Drug-induced corneal complication. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 15, n. 6, p. 541-548, 2004.

HOLLY, F.J.; ESQUIVEL, E.D. Colloid osmotic pressure of artificial tears. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 327-36, 1985.

HSU, J. Drug delivery methods for posterior segment disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 18, n. 3, p. 235-9, 2007.

HUANG, F.C.; TSENG, S.H.; SHIH, M.H.; CHEN, F.K. Effect of artificial tears on corneal surface regularity, contrast sensitivity, and glare disability in dry eyes. **Ophthalmology**, v. 109, n. 10, p. 1934-40, 2002.

HUANG, Y.C.; CHIANG, C.H.; YEH, M.K. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by *spray drying* method. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 2, p. 235-9, 2007.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. v. 2005.

ISHIDA, N.; RAO, G.N.; DEL CERRO, M.; AQUAVELLA, J.V. Corneal nerve alterations in *diabetes mellitus*. **Archives of Ophthalmology**, v. 102, n. 9, p. 1380-4, 1984.

JARVINEN, K.; JARVINEN, T.; URTTI, A. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-19, 1995.

JI, J.J.; DING, Z.J.; YANG, X.L. Preparation and properties of chitosan film as a drug sustained-release system. **West China Journal of Stomatology**, v. 27, n. 3, p. 248-51, 2009.

JORGE, A.G.; MODULO, C.M.; DIAS, A.C.; BRAZ, A.M.; FILHO, R.B.; JORDÃO-JUNIOR, A.A.; PAULA, J.S.; ROCHA, E.M. Aspirin prevents diabetic oxidative changes in rat lacrimal gland structure and function. **Endocrine**, v. 35, n. 2, p. 189-97, 2009.

JUHASZ, J.; LENAERTS, V.; RAYMOND, P.; ONG, H. Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. **Biomaterials**, v. 10, n. 4, p. 265-8, 1989.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 488.

KAISERMAN, I.; KAISERMAN, N.; NAKAR, S.; VINKER, S. Dry eye in diabetic patients. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 3, p. 498-503, 2005.

KAJI, Y.; AMANO, S.; USUI, T.; OSHIKA, T.; YAMASHIRO, K.; ISHIDA, S.; SUZUKI, K.; TANAKA, S.; ADAMIS, A.P.; NAGAI, R.; HORLUCI, S. Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 2, p. 521-8, 2003.

KAJI, Y.; USUI, T.; OSHIKA, T.; MATSUBARA, M.; YAMASHITA, H.; ARAIE, M.; MURATA, T.; ISHIBASHI, T.; NAGAI, R.; HORLUCI, S.; AMANO, S. Advanced glycation end products in diabetic corneas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 2, p. 362-8, 2000.

KAO, H.J.; LIN, H.R.; LO, Y.L.; YU, S.P. Characterization of pilocarpine-loaded chitosan/carbopol nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 179-86, 2006.

KASUGA, M.; HEDO, J.A.; YAMADA, K.M.; KAHN, C.R. Structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. **The Journal of Biological Chemistry.**, v.257, n.17, p.10392-10399, 1982.

KAUR, I.P.; GARG, A.; SINGLA, A.K.; AGGARWAL, D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 1-14, 2004.

KAUR, I.P.; KANWAR, M. Ocular preparations: the formulation approach. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v. 48, n. 5, p. 473-93, 2002.

KERN, T.J. Diseases of the córnea and sclera. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual of Small Animal Practice**. 2 ed. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders, 1994. P.1197-1207.

KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M.; FLANAGAN, D. Drug transfer through mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 173-193, 2001.

KIM, E.Y.; GAO, Z.G.; PARK, J.S.; LI, H.; HAN, K. rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 159-67, 2002.

KINOSHITA, S.; ADACHI, W.; SOTOZONO, C.; NISHIDA, K.; YOKOI, N.; QUANTOCK, A.J.; OKUBO, K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, n. 5, p. 639-73, 2001.

KLAUSNER, E.A.; PEER, D.; CHAPMAN, R.L.; MULTACK, R.F.; ANDURKAR, S.V. Corneal gene therapy. **Journal of Control Release**, v. 124, n. 3, p. 107-33, 2007.

KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. **Experimental Eye Research**, v. 79, p. 677-88, 2004.

KOJIMA, M.; SUN, L.; HATA, I.; SAKAMOTO, Y.; SASAKI, H.; SASAKI, K. Efficacy of alpha-lipoic acid against diabetic cataract in rat. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 51, n. 1, p. 10-3, 2007.

KOMPELLA, B.U.; BANDI, N.; AYALASOMAYAJULA, S.P. Subconjunctival nano and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 3, p. 1192-1201, 2003.

KONRADE, K.A.; HOFFMAN, A.R.; RAMEY, K.L.; GOLDENBERG, R.B.; LEHENBAUER, T.W. Refractive states of eyes and associations between ametropia and age, breed, and axial globe length in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 2, p. 279-84, 2012.

KURPAKUS-WHEATER, M.; KERNACKI, K.A.; HAZLETT, L.D. Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 179-259, 2001.

LE BOURLAIS, C.; ACAR, L.; ZIA, H.; SADO, P.A.; NEEDHAM, T.; LEVERGE, R. Ophthalmic drug delivery systems – Recent advances. **Progress in Retina and Eye Research**, v. 17, n. 1, p. 33-58, 1998.

LEE, A.J.; LEE, J.; SAW, S.M.; GAZZARD, G.; KOH, D.; WIDIAIA, D.; TAN, D.T. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 12, p. 1347-51, 2002.

LEE, V.H.; ROBINSON, J.R. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. **Journal of Ocular Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 67-108, 1986.

LEITE, A.G.B.; OLIVEIRA, D.; BARALDI-ARTONI, S.M. Morphology of ocular system of domestic animals. **ARS Veterinária**, v. 29, n. 1, p. 42-51, 2013.

LEMP, M.A. Epidemiology and classification of dry eye. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 438, p. 791-803, 1998.

LI, D.Q.; TSENG, S.C. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. **Journal of Cellular Physiology**, v. 163, n. 1, p. 61-79, 1995.

LIN, H.R.; SUNG, K.C.; VONG, W.J. *In situ* gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 6, p. 2358-65, 2004.

LIN, P.Y.; CHENG, C.Y.; HSU, W.M.; TSAI, S.Y.; LIN, M.W.; LIU, J.H.; CHOU, P. Association between symptoms and signs of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the shihpai eye study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 5, p. 1593-8, 2005.

LIU, W.; GRIFFITH, M.; LI, F. Alginate microsphere-collagen composite hydrogel for ocular drug delivery and implantation. **Journal of Material Science**, v. 19, n. 11, p. 3365-71, 2008.

LIU, Y.; PETREACA, M.; YAO, M.; GREEN-MARTINS, M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. **BMC Cell Biology**, v. 10, n.1, p. 1-15, 2009.

LU, L.; REINACH, P.S.; KAO, W.W. Corneal epithelial wound healing. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 7, p. 653-64, 2001.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1595-1639, 2005.

LUDWIG, A.; VAN OOTEGHEM, M. The influence of the osmolality on the precorneal retention of ophthalmic solutions. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 42, n. 4, p. 259-66, 1987.

LUZ, A.; URSULIO, M.; CASTANEDA, D.; AMBROSIO-JR, R. Corneal thickness progression from the thinnest point to the limbus: study based on a normal and a keratoconis population to create reference values. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, v. 69, n. 4, p. 579-83, 2006.

MAA, Y.F.; NQUYEN, P.A.; SIT, K.; HSU, C.C. *Spray drying* performance of a bench-top spray dryer for protein aerosol powder preparation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 3, p. 301-9, 1998.

MACRI, F.J.; CEVARIO, S.J. Ciliary ganglion stimulation. II. Neurogenic, intraocular pathway for excitatory effects on aqueous humor production and outflow. **Investigative Ophthalmology**, v. 14, n. 6, p. 471-5, 1975.

MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TAKEUCHI, H. Mucoadhesive drug carries and polymers for effective drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 18, n. 6, p. 375-86, 2008.

MALAVAZZI, G.R.; LAKE, J.C.; DANTAS, P.E.C. Effect of honey and autologous serum on corneal epithelial healing in rabbits. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, n. 3, p. 347-51, 2005.

MALTESEN, M. J.; BJERREGAARD, S.; HOVGAARD, L.; HAVELUND, S.; WEERT, M. V. Quality by design – *Spray drying* of insulin intended for inhalation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 828-38, 2008.

MAO, S.; BAKOWSKY, U.; JINTAPATTANAKIT, A.; KISSEL, T. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 95, n. 5, p. 1035-48, 2006.

MARTINEZ, A.J.; MILLS, M.B.; JACELDO, K.B.; TIO, F.O.; AIGBIYBALU, I.B.; HILSENBECK, S.B.; YEE, R.W. Standardization of conjunctival impression cytology. **Cornea**, v. 14, n. 5, p. 512-22, 1995.

MATHERS, W.D.; LANE, J.A.; ZIMMERMAN, M.B. Tear film changes associated with normal aging. **Cornea**, v. 15, n. 3, p. 229-34, 1996.

MAYO, L.; QUAGLIA, F.; BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L.; LA ROTONDA, M.I. A novel poloxamers/hyaluronic acid *in situ* forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and *in vitro* release properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 199-206, 2008.

McCULLEY, J.P.; UCHIYAMA, E.; ARONOWICZ, J.D.; BUTOVICH, I.A. Impact of evaporation on aqueous tear loss. **Transaction of the American Ophthalmological Society**, v. 104, p. 121-8, 2006.

McCAA, C.S. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 44, p. 1-8, 1982.

MCLEAN, I.W.; BURNIER, M.N.; ZIMMERMAN, L.E.; JAKOBIEC, F.A. **Tumors of the eye and ocular anexa**. 3 ed., Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1994.

MD Anderson Cancer Center – The University of Texas. “Eye cancer” [online]. Disponível em: <<http://www.mdanderson.org/patient-and-cancer-information/cancer-information/cancer-types/eye-cancer/eye-full.jpg>>. Acesso em 19 de junho de 2014.

MILJANOVIC, B.; DANA, R.; SULLIVAN, D.A.; SCHAUMBERG, D.A. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. **American Journal of Ophthalmology**, v. 143, n. 3, p. 409-15, 2007.

MISHIMA, S. Clinical Investigations on the corneal endothelium. **Ophthalmology**, v. 89, n. 6, p. 525-30, 1982.

MODIS, L.Jr.; LANGENBUCHER, A.; SEITZ, B. Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. **Cornea**, v. 20, n. 7, p. 711-4, 2001.

MODULO, C.M.; JORGE, A.G.; DIAS, A.C.; BRAZ, A.M.; FILHO, R.B.; JORDÃO-JUNIOR, A.A.; MARCHINI, J.S.; ROCHA, E.M. Influence of insulin treatment on the lacrimal gland and ocular surface of diabetic rats. **Endocrine**, v. 36, n. 1, p. 161-8, 2009.

MOSS, S.E.; KLEIN, R.; KLEIN, B.E. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. **Archives Ophthalmology**, v. 118, n. 9, p. 1264-8, 2000.

MOSS, S.E.; KLEIN, R.; KLEIN, B.E. Incidence of dry eye in an older population. **Archives Ophthalmology**, v. 122, n. 3, p. 369-73, 2004.

MUCCIOLI, C.; CAMPOS, M.; GOLDCHMIT, M.; DANTAS, P.E.C.; BECHARA, S.J.; COSTA, V.P. A córnea não é um pedaço de plástico. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 69, n. 5, p. 629-30, 2006.

MYRNA, K.E.; POT, S.A.; MURPHY, C.J. Meet the corneal myofibroblast: the role of myofibroblast transformation in corneal wound healing and pathology. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, Suppl 1, p. 25-7, 2009.

NAGASAKI, T.; ZHAO, J. Centripetal movement of corneal epithelial cells in the normal adult mouse. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 2, p. 558-66, 2003.

NAGAYASU, A.; HIRAYANAGI, T.; TANAKA, Y.; TANGKAWATTANA, P.; UEDA, H.; TAKEHANA, K. Site-dependent differences in collagen lamellae in the corneal substantia própria of beagle dogs. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 71, n. 9, p. 1229-31, 2009.

NAGYOVA, B.; TIFFANY, J.M. Components responsible for the surface tension of human tears. **Current Eye Research**, v. 19, n. 1, p. 4-11, 1999.

NANJAWADE, B.K.; MANVI, F.V.; MANJAPPA, A.S. *In situ*-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. **Journal of Control Release**, v. 122, n. 2, p. 119-34, 2007.

NAVARRO, I.; LEIBUSH, B.; MOON, T.W.; PLISETSKAYA, E.M.; BAÑOS, N.; MÉNDEZ, E.; PLANAS, J.V.; GUTIÉRREZ, J. Insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and glucagon: the evolution of their receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122, n. 1, p. 137-53, 1999.

NELSON, J.D. Impression cytology. **Cornea**, v. 7, n. 1, p. 71-81, 1988.

NELSON, J.D.; HAVENER, V.R.; CAMERON, J.D. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. **Archives of Ophthalmology**, v. 101, n. 12, p. 1869-72, 1983.

NISHIDA, K.; KAWASAKI, S.; KINOSHITA, S. Clusterin may be essential for maintaining ocular surface epithelium as a non-keratinizing epithelium. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 438, p. 629-35, 1998.

NISHIDA, T. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*. **The Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 5, p. 1653-7, 1983.

NOITE, M.S.; KARAM, J.H. **Hormônios pancreáticos e fármacos antidiabéticos**. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*, 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 991 p. cap. 41, p. 579-597, 2005.

OGURA, Y. Drug delivery to the posterior segment of eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 1, p. 1-3, 2001.

OHASHI, Y.; MOTOKURA, M.; KINOSHITA, Y.; MANO, T.; WATANABE, H.; KINOSHITA, S.; MANABE, R.; OSHIDEN, K.; YANAIHARA, C. Presence of epidermal growth factor in human tears. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, n. 8, p.1879-82, 1989.

OLIVEIRA, B.F.; DE SANTANA, M.H.A.; RE, M.I. Spray-dried chitosan microspheres as a pDNA carrier. **Drying Technology**, v. 24, n. 3, p. 373-82, 2006.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por *spray drying* e usadas na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1195-1201, 2009.

OLIVER, C.; WATERS, J.F.; TOLBERT, C.L.; KLEINMAN, H.K. Growth of exocrine acinar cells on a reconstituted basement membrane gel. **In vitro cellular and developmental biology**, v. 23, n. 7, p. 465-73, 1987.

OLMEZ, G.; CAKMAK, S.S.; SOKER, S.I.; NERGIZ, Y.; YILDIZ, F. Effects of Intravitreal Ropivacaine on Retinal Thickness and Integrity in the Guinea Pig. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, v. 66, n. 4, p. 394-400, 2005.

OWENS, D. R.; GRIMLEY, J.; KIRKPATRICK, P. Inhaled human insulin. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 371-2, 2006.

PARIKH, R.H.; PARIKH, J.R.; DUBEY, R.R.; SONI, H.N.; KAPADIA, K.N. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-fluorouracil: optimization of process parameters. **AAPS PharmaSciTech**, v. 4, n. 2, E13, 2003.

PATEL, D.V.; MCGHEE, C.N. Mapping of the normal human corneal sub-basal nerve plexus by *in vivo* laser scanning confocal microscopy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 12, p. 4485-8, 2005.

PATEL, S.; FARRELL, J.C. Age-related changes in precorneal tear film stability. **Optometry & Vision Science**, v. 66, n. 3, p. 175-8, 1989.

PANETH, N.; QIU, H.; ROSENBAUM, P.; SAIGAL, S.; BISHAI, S.; JETTON, J.; OUDEN, L.D.; BROYLES, S.; TYSON, J.; KUGLER, K. Reliability of classification of cerebral palsy in low-birthweight children in four countries. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 45, n. 9, p. 628-33, 2007.

PEPONIS, V.; BONOVAS, S.; KAPRANOU, A.; PEPONI, E.; FILIOUSSI, K.; MAGKOU, C.; SITARAS, N. M. Conjunctival and tear film changes after vitamin C and E administration in non-insulin dependent *diabetes mellitus*. **Medical Science Monitor**, v. 10, n. 5, p. 213-7, 2004.

PEPONIS, V.; PAPATHANASIOU, M.; KAPRAOU, A.; MAGKOU, C.; TYLIGADA, A.; MELIDONIS, A.; DROSOS, T.; SITARAS, N.M. Protective role of oral antioxidant

supplementation in ocular surface of diabetic patients. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 12, p. 1369-73, 2002.

PIGATTO, J.A.; CERVA, C.; FREIRE, C.D.; ABIB, F.C.; BELLINI, L.P.; BARROS, P.S.; LAUS, J.S. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 9, p. 427-30, 2008.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; PUGLISI, G. Ocular tolerability of Eudragit RS 100 and RL 100 nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 12, p. 2636-41, 2002.

PILLION, D.J.; BARTLETT, J.D.; MEEZON, E.; YANG, M.; CRAIN, R.J.; GRIZZLE, W.E. Systemic absorption of insulin delivered topically to the rat eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 12, p. 3021-27, 1991.

POLONSKY, K.S. The Past 200 Years in Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 14, p. 1332-40, 2012.

PRICE, F. W. Jr.; WILLES, L.; PRICE, M.; LYNG, A.; RIES, J. A prospective, randomized comparison of the use *versus* non-use of topical corticosteroids after laser *in situ* keratomileusis. **Ophthalmology**, v. 108, n. 7, p. 1236-44, 2001.

QI, H.; CHEN, W.; HUANG, C.; LI, L.; CHEN, C.; LI, W.; WU, C. Development of poloxamer analogs/carbopol-based *in situ* gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 178-87, 2007.

RAMOS-REMUS, C.; SUAREZ-ALMAZOR, M.; RUSSELL, A.S. Low tear production in patients with *diabetes mellitus* is not due to Sjögren's syndrome. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 12, n. 4, p. 375-80, 1994.

RIOS, J.D.; HORIKAWA, Y.; CHEN, L.L.; KUBLIN, C.L.; HODGES, R.R.; DARTT, D.A.; ZOUKHRI, D. Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response. **Experimental Eye Research**, v. 80, n. 4, p. 477-91, 2005.

ROCHA, E. M; WICKHAM, L. A.; SILVEIRA, L. A.; KRENZER, K. L.; YU, F-S.; TODA, I.; SULLIVAN, B. D.; SULLIVAN, D. A. Identification of androgen receptor protein and 5 α -reductase mRNA in human ocular tissues. **British Journal of Ophthalmology**, v. 84, n. 1, p. 76-84, 2000.

ROCHA, E. M.; CUNHA, D. A.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A. Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 4, p. 963-967, 2002.

RODRIGUES, G.N.; LAUS, J.L.; SANTOS, J.M.; RIGUEIRO, M.P.; SMITH, R.L. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 2, p. 101-7, 2006.

RODRIGUES, L.B.; LEITE, H.F.; YOSHIDA, M.I.; SALIBA, J.B.; CUNHA, A.S.; FARACO, A.A.G. *In vitro* release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, n. 1-2, p. 1-6, 2009.

REKHA, M. R.; SHARMA, C. P. Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. **Journal of Controlled Release**, v. 135, n. 2, p. 144-51, 2009.

SADRZADEH, N.; MILLER, D. P.; DECHUGA-BALLESTEROS, D.; HARPER, N. J.; STEVENSON, C. L.; BENNETT, D. B. Solid-state stability of *spray-dried* insulin powder for inhalation: chemical kinetics and structural relaxation modeling of Exubera® above and below the glass transition temperature. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 9, p. 3698-3710, 2010.

SADY, C.; KHOSROF, S.; NAGARAJ, R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, n. 3, p. 793-7, 1995.

SAISHIN, Y.; SILVA, L.R.; SAISHIN, Y.; CALLAHAN, K.; SCHOCH, C.; ABLBEIM, M.; LAI, H.; KANE, F.; BRAZZELL, B.K.; BODMER, D.; CAMPOCHIARO, A. P. Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal neovascularization in porcine model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 11, p. 4989-4993, 2003.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1-2, p. 147-54, 2006a.

SAJEESH, S.; SHARMA, C.P. Interpolymer complex microparticles based on polymethacrylic acid-chitosan for oral insulin delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 2, p. 506-12, 2006b.

SANTOS, J.V.; MOURA, T.F.A.; RAFFIN, F.N. Otimização dos parâmetros de secagem por aspersão de micropartículas de quitosana como carreadores de insulina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 4, p. 327-33, 2003.

SCHAUMBERG, D.A.; SULLIVAN, D.A. DANA, M.R. Epidemiology of dry eye syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.506, p. 989-98, 2002.

SCHIPPER, N.G.; OLSSON, S.; HOOGSTRAATE, J.A.; DEBOER, A.G.; VARUM, K.M.; ARTURSSON, P. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 923-9, 1997.

SCHOENWALD, R.D. Ocular drug delivery. Pharmacokinetic consideration. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 18, n. 4, p. 255-69, 1990.

SELIMOT, H.A.; FATIMA, B.; JOSHUA, O.; ABEL, O.; IBRAHIM, H.O. Chemical analysis and characterization of shrimp chitosan in shrimp Shell waste from lagos lagoon, Nigeria. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 11, p. 377-85, 2013.

SHAH, P.P.; MASHRU, R.C.; THAKKAR, A.R.; BADHAN, A.C. Effect of chitosan crosslinking on bitterness of artemether using response surface methodology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 421-7, 2008.

SHANLEY, L. J.; McCAIG, C. D.; FORRESTER, J. V.; ZHAO, M. Insulin, not leptin, promotes *in vitro* cell migration to heal monolayer wounds in human corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 4, p. 1088-94, 2004.

SHULTZ, G.S.; CIPOLLA, L.; WHITEHOUSE, A.; EIFERMAN, R.A.; WOOST, P.G.; JUMBLATT, M.M. Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents. **Cornea**, v. 11, n. 1, p. 20-7, 1992.

SILVA, M.; LIMA, W.G.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 1, p. 46-53, 2011.

SIMAMORA, P.; NADKARNI, S.R.; LEE, Y.C.; YALKOWSKY, S.H. Controlled delivery of pilocarpine 2. *In vivo* evaluation of Gelfoam (R) device. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, n. 2, p. 209-214, 1998.

SINDING, C. Making the unit of insulin: standards, clinical work, and industry, 1920-1925. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 76, n. 2, p. 231-70, 2002.

SLATTER, D.; DIETRICH, U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 2007. Cap.91, p.1368-1396.

SMOLIN, G.; THOFT, R.A. **The cornea: scientific foundations and clinical practice**. 2 ed. Boston: Little, Brown and Company, 1987, p. 38-49.

SOCHA, M.; SAPIN, A.; DAMGE, C.; MAINCENT, P. Influence of polymers ratio on insulin-loaded nanoparticles based on poly- ϵ -caprolactone and Eudragit RS for oral administration. **Drug Delivery**, v. 16, n. 8, p. 430-6, 2009.

SO, H.M.; LEE, C.C.H.; LEUNG, A.K.H. Comparing the effectiveness of polyethylene covers (Glad Wrap TM) with lanolin (Duratears) eye ointment to prevent corneal abrasions in critically ill patients: A randomized controlled study. **International Journal Nursing of Studies**, v. 45, p. 1565-71, 2008.

SOLOMON, A.; DURSUN, D.; LIU, Z.; XIE, Y.; MACRI, A.; PFLUGFELDER, S.C. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 10, p. 2283-92, 2001.

SONAJE, K.; LIN, Y-H.; JUANG, J-H.; WEY, S-P.; CHEN, C-T.; SUNG, H-W. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2329-39, 2009.

SONAJE, K.; LIN, K-J.; WEY, S-P.; LIN, C-K.; YEH, T-H.; NGUYEN, H-N.; HSU, C-W.; YEN, T-C.; JUANG, J-H.; SUNG, H-W. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: oral delivery using pH-responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. **Biomaterials**, v. 31, n. 26, p. 6849-58, 2010.

SONIA, T.A.; REKHA, M.R.; SHARMA, C.P. Bioadhesive hydrophobic chitosan microparticles for oral delivery of insulin: *in vitro* characterization and *in vivo* uptake studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 5, p. 2902-10, 2011.

STAHL, K.; CLAEISSON, M.; LILLIEHORN, P.; LINDEN, H.; BACKSTROM, K. The effect of process variables on the degradation and physical properties of *spray dried* insulin intended for inhalation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 227-37, 2002.

STEVES, M.J.; DANANBERG, J.; FELDMAN, E.L.; LATTIMER, S.A.; KAMIJO, M.; THOMAS, T.P.; SHINDO, H.; SIMA, A.A.; GREENE, D.A. The linked roles of nitric oxide, aldose, reductase and (Na⁺K⁺)-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 2, p. 853-9, 1994.

STRISSEL, K.J.; RINEHART, W.B.; FINI, M.E. Regulation of paracrine cytokine balance controlling collagenase synthesis by corneal cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 2, p. 546-52, 1997.

SULLIVAN, D.A.; HANN, L.E. Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: endocrine impact on the lacrimal gland accumulation and secretion of IgA and IgG. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 34, n. 1-6, p. 253-62, 1989.

SULLIVAN, D.A.; KRENZER, K.L.; SULLIVAN, B.D.; TOLLS, D.B.; TODA, I.; DANA, M.R. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 40, n. 6, p. 1261-5, 1999.

SULLIVAN, T.J.; VALENZUELA, A.A. Imaging features of ocular adnexal lymphoproliferative disease. **Eye**, v. 20, n. 10, p. 1189-95, 2006.

TANDON, A.; TOVEY, J. C. K.; SHARMA, A.; GUPTA, R.; MOHAN, R. R. Role of transforming growth factor beta in corneal function, biology and pathology. **Current Molecular Medicine**, v. 10, n. 6, p. 565-578, 2010.

TERVO, T.; VESALUOMA, M.; BENNETT, G.L.; SCHWALL, R.; HELENA, M.; LIANG, Q.; WILSON, S.E. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. **Experimental Eye Research**, v. 64, n. 4, p. 501-4, 1997.

TEWA-TAGNE, P.; DEGOBERT, G.; BRIANC, S.; BORGES, C.; GAUVRIT, J. Y.; LANTERI, P.; FESSI, H. *Spray drying* nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: formulation and process variables optimization using experimental designs. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 4, p. 650-661, 2007.

THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 24, n. 10, p. 1442-3, 1983.

THOMPSON, C.J.; HANSFORD, D.; HIGGINS, S.; ROSTRON, C.; HUTCHEON, G.A.; MUNDAY, D.L. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 53-61, 2007.

TOMLINSON, A.; KHANAL, S.; RAMAESH, K.; DIAPER, C.; MACFADYEN, A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 47, n. 10, p. 4309-15, 2006.

TSENG, S.C.; TSUBOTA, K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. **American Journal of Ophthalmology**, v. 124, n. 6, p. 825-35, 1997.

TSUBOTA, K.; NAKAMORI, K. Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. **Archives of Ophthalmology**, v. 113, n. 2, p. 155-8, 1995.

URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. **Survey of Ophthalmology**, v. 37, n. 6, p. 435-56, 1993.

VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 11-21, 2007.

VAN HAERINGEN, N.J. Clinical biochemistry of tears. **Survey of Ophthalmology**, v. 26, n. 2, p. 84-96, 1981.

VAREWIJCK, A.J.; JANSSEN, J.A.M.J.L. Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 5, p. F63-75, 2012.

VARSHOSAZ, J.; SADRAI, H.; ALINAGARI, R. Nasal delivery of insulin using chitosan microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 7, p. 761-74, 2004.

Virtual Medical Centre, "**Anatomy of the eye**," 2011. [Online]. Disponível em: <<http://www.virtualmedicalcentre.com/anatomy/the-eye-and-vision/28>>. Acesso em: 20 de junho de 2014.

WAKUTA, M.; MORISHIGE, N.; CHIKAMA, T.; SEKI, K.; NAGANO, T.; NICHIDA, T. Delayed wound closure and phenotypic changes in corneal epithelium of the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.48, n.2, p. 590-6, 2007.

WALLCOTT, B. The lacrimal gland and its veil of tears. **News in Physiological Science**, v. 13, p. 97-103, 1998.

WATANABE, H. Significance of mucin on the ocular surface. **Cornea**, v. 21, n. 2, Suppl. 1, p. 17-22, 2002.

WATSKY, M.A. Loss of fenamate-activated K⁺ current from epithelial cells during corneal wound healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 7, p. 1356-63, 1999.

WEI, G.; XU, H.; DING, P.T.; LI, S.M.; ZHANG, J.M. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 1, p. 65-74, 2002.

WEI-LI, C. **Topical autologous insulin application for the treatment of corneal epithelium defect after ocular surgeries.** Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01031888>>. Acesso em: 16 maio 2014.

WHITE, M.F.; KAHN, C.R. The insulin signaling system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 1, p. 1-4, 1994.

WHITTINGHAM, J.L.; ZHANG, Y.; ZAKOVA, L.; DODSON, E.J.; TURKENBURG, J.P.; BRAGE, J.; DODSON, G.G. I222 crystal form of despentapeptide (B26-B30) insulin provides new insights into the properties of monomeric insulin. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 62, n. 5, p. 505-11, 2006.

WILSON, S.E.; HE, Y.G.; WENG, J.; LI, Q.; McDOWALL, A.W.; VITAL, M.; CHWANG, E.L. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. **Experimental Eye Research**, v. 62, n. 4, p. 325-7, 1996.

WILSON, S.E.; LIANG, Q.; KIM, W.J. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 10, p. 2185-90, 1999.

WILSON, S.E.; MOHAN, R.R.; MOHAN, R.R.; AMBROSIO-JUNIOR, R.; HONG, J.; LEE, J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, n. 5, p. 625-37, 2001.

WU, S.; TAO, Y.; ZHANG, H.; SU, Z. Preparation and characterization of water-soluble chitosan microparticles loaded with insulin using the polyelectrolyte complexation method. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

YAMAMOTO, A.; LUO, A.M.; DODDA-KASHI, S.; LEE, V.H. The ocular route for systemic insulin delivery in the albino rabbit. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 249, n. 1, p. 249-55, 1989.

YIN, H.B.; GONG, C.Y.; SHI, S.A.; LIU, X.Y.; WEI, Y.Q.; QIAN, Z.Y. Toxicity evaluation of biodegradable and thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel as a potential *in situ* sustained ophthalmic drug delivery system. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 92, n. 1, p. 129-37, 2010.

YIN, M.J.; YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of $I\kappa\beta$ kinase- β . **Nature**, v. 396, n. 6706, p. 77-80, 1998.

YOON, K.; IM, S.; SEO, M. Changes of the tear film and ocular surface in diabetes mellitus. **Korean Journal of Ophthalmology**, v. 18, n. 2, p. 168-74, 2004.

YOSHIDA, M.; KIMURA, H.; KYUKI, K.; ITO, M. Combined effect of vitamin E and insulin on cataracts of diabetic rats feed a high cholesterol diet. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 338-44, 2004.

YU, F-S. X.; YIN, J.; XU, K.; HUANG, J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2-3, p. 229-235, 2010.

ZAGON, I.S.; KLOCEK, M.S.; SASSANI, J.W.; McLAUGHLIN, P.J. Use of topical insulin to normalize corneal epithelial healing in *diabetes mellitus*. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 8, p. 1082-8, 2007.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; McLAUGHLIN, P.J. Insulin treatment ameliorates impaired corneal reepithelialization in diabetic rats. **Diabetes**, v. 55, n. 4, p. 1141-7, 2006.

ZIB, I.; RASKIN, P. Novel insulin analogues and its mitogenic potential. **Diabetics, Obesity & Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 611-20, 2006.

ZOUKHRI, D.; KUBLIN, C.L. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjogren's syndrome. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 5, p. 925-32, 2001.