

# Injeção intravítrea de polissorbato 80: estudo funcional e morfológico

## *Intravitreal injection of polysorbate 80: a functional and morphological study*

FRANCISCO MAX DAMICO<sup>1</sup>; FÁBIO GASPARIN<sup>1</sup>; GABRIELA LOURENÇON IOSHIMOTO<sup>2</sup>; THAIS ZAMUDIO IGAMI<sup>1</sup>; ARMANDO DA SILVA CUNHA JR.<sup>3</sup>; SILVIA LIGORIO FIALHO<sup>4</sup>; ANDRE MAURICIO LIBER<sup>2</sup>; LUCY HWA-YUE YOUNG<sup>5</sup>; DORA FIX VENTURA<sup>2</sup>.

### R E S U M O

**Objetivo:** determinar os efeitos funcionais e morfológicos na retina de coelhos da concentração de PS80 utilizada na preparação de drogas intravítreas. **Métodos:** onze coelhos *New Zealand* receberam injeção intravítrea de 0,1ml de PS80. Como controle, o olho contralateral de cada coelho recebeu o mesmo volume de soro fisiológico. Foram realizados eletrorretinogramas de acordo com o protocolo modificado, biomicroscopia e mapeamento de retina antes da injeção, sete e dez dias depois. Os animais foram sacrificados no 30o dia e as retinas analisadas por microscopia de luz. **Resultados:** os olhos injetados com PS80 não apresentaram sinais clínicos de inflamação intraocular. O eletrorretinograma não apresentou alteração de amplitude e tempo implícito das ondas a e b nas condições escotópica e fotópica. Não houve alteração morfológica da retina na microscopia de luz. **Conclusão:** a injeção intravítrea de PS80 na concentração utilizada na preparação de drogas intravítreas não causa alterações funcionais e morfológicas na retina de coelhos. Esses resultados sugerem que o PS80 não é tóxico para a retina de coelhos e pode ser usado com segurança na preparação de novas drogas lipofílicas para injeção intravítrea.

**Descritores:** Polissorbatos. Retina. Eletrorretinografia. Injeções Intravítreas. Achados Morfológicos e Microscópicos.

### INTRODUÇÃO

O acesso de drogas à retina e à coroide sempre foi um desafio aos oftalmologistas devido à existência de duas barreiras anatômicas (barreiras hematorretinianas interna e externa) que dificultam a penetração das drogas no segmento posterior do bulbo ocular. O tratamento das causas de cegueira secundárias a doenças retinianas e da coroide mais prevalentes (degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética) mudou radicalmente com a popularização da injeção intravítrea de agentes terapêuticos no segmento posterior do bulbo ocular<sup>1</sup>. A injeção intravítrea de drogas ultrapassa a barreira hematorretiniana externa e garante que a retina e a coroide recebam níveis terapêuticos, diminuindo significativamente a absorção sistêmica das drogas e sua toxicidade. De acordo com a legislação brasileira e mundial, a injeção intravítrea de drogas é um procedimento cirúrgico e deve ser realizado sob rigorosa técnica asséptica.

As drogas mais comumente injetadas no vítreo são os anticorpos monoclonais (principalmente os inibido-

res do fator de crescimento do endotélio vascular), corticosteroides e antibióticos, mas teoricamente, qualquer droga pode ser injetada no vítreo. No entanto, alguns aspectos farmacológicos têm que ser considerados, como a solubilidade aquosa do composto, a farmacocinética e as propriedades bioquímicas dos compostos, assim como sua interação com o vítreo<sup>2</sup>.

Os polissorbatos, uma classe de surfactantes não iônicos, são excipientes muito úteis utilizados em várias formulações farmacêuticas para uso endovenoso com diferentes objetivos. Os polissorbatos aumentam a solubilidade de drogas em suspensões pouco ou nada solúveis, para a obtenção de dispersões aquosas. Nesses casos, a concentração dos surfactantes varia de 0,05% a 0,5%, dependendo do conteúdo sólido da formulação. Os polissorbatos também são utilizados na formulação de soluções injetáveis para aumentar a absorção de drogas solúveis devido à formação de micelas. Adicionalmente, os polissorbatos também são utilizados para estabilizar as proteínas em formulações de anticorpos monoclonais. Praticamente todas essas formulações contêm polissorbato 20 ou 80.

1 - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, São Paulo, SP, Brasil. 2 - Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, Departamento de Psicologia Experimental, São Paulo, SP, Brasil. 3 - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Belo Horizonte, MG, Brasil. 4 - Fundação Ezequiel Dias, Divisão de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico, Belo Horizonte, MG, Brasil. 5 - Harvard Medical School, Departamento de Oftalmologia, Boston, MA, Estados Unidos da América.

O polissorbato 80, também conhecido como polyoxietileno-sorbitan-20 mono-oleato ou *Tween 80®* (PM: 428.60, FM: C24H44O6, solubilidade em água: 5-10g/100 ml a 23°C), é um tipo de polissorbato utilizado para estabilizar formulações aquosas de medicamentos para uso tópico, parenteral e intravítreo. É também um agente solubilizante em colírios e um importante componente na preparação de suspensão de drogas lipofílicas.

A segurança do uso sistêmico do PS80 é controversa. O PS80 não apresenta neurotoxicidade em ratos recém-nascidos, após a administração de doses altas por via oral durante a gestação, não induzindo a alterações de desenvolvimento, funcionais do sistema nervoso central, locomotoras ou dos reflexos<sup>3</sup>. Em animais adultos, a ingestão oral de doses altas de PS80 é segura em camundongos, ratos, cães e macacos<sup>4</sup>. No entanto, a injeção intraperitoneal de PS80 em ratas recém-nascidas causa alterações morfológicas e funcionais no útero e ovários<sup>5</sup>. Além disso, o PS80 pode estar associado à reação anafilática, não imunológica, após administração endovenosa durante a gestação<sup>6</sup>.

Os efeitos do PS80 na superfície ocular foram estudados em vários modelos experimentais. A injeção subtenoniana de PS80 em coelhos provocou menos sinais de toxicidade na superfície ocular que outros agentes comumente utilizados nas formulações tópicas para uso ocular, como carboximetilcelulose, polietileno glicol, álcool benzílico, cloreto de benzalcônio e metilcelulose<sup>7</sup>. O PS80 também parece ter um papel protetor no epitélio corneano de células mantidas em cultura, uma vez que reduz a toxicidade induzida pelo cloreto de benzalcônio, um preservativo comumente usado na formulação de colírios<sup>8,9</sup>.

A formulação mais utilizada comercialmente da triancinolona acetona (TA) contém PS80. A TA é um glicocorticoide sintético com efeito prolongado que vem sendo largamente utilizada no tratamento de doenças da retina por injeção intravítrea, mas os estudos da sua segurança apresentam resultados muito controversos. Alguns estudos experimentais in vivo sugerem que injeção intravítrea de TA, cuja formulação contém PS80, é segura<sup>10-12</sup>. No entanto, outros estudos experimentais sugerem que a formulação de TA sem preservativo é menos tóxica à retina após injeção intravítrea que a formulação mais comum<sup>13-15</sup>. Como o veículo utilizado na formulação da TA contém muitos compostos, como álcool benzílico, carboximetilcelulose, PS80, hidróxido de sódio e ácido clorídrico, o papel que

cada um desses compostos exerce na toxicidade retiniana ainda permanece incerto<sup>16-18</sup>.

Embora o PS80 seja frequentemente utilizado na preparação de formulações destinadas ao uso ocular, incluindo medicações para uso intravítreo, seus efeitos sobre a retina após injeção intravítrea nunca foram estudados. O objetivo deste estudo é determinar as alterações funcionais e morfológicas na retina de coelhos causadas pelo PS80, na mesma concentração utilizada na preparação de novas drogas para uso intravítreo.

## MÉTODOS

Foram utilizados 11 coelhos albinos *New Zealand* (peso entre 2,0 e 3,0 kg). Os animais foram tratados de acordo com as normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (número 029, folha 43, livro 2) e da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (número 07.2010).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob ciclo claro-escuro de 12 horas e tinham acesso livre a água e ração. As pupilas foram dilatadas com colírio de tropicamida 0,5% e os olhos foram anestesiados com colírio de proximetacaína. Antes da injeção intravítrea, eletrorretinograma e eutanásia, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de hidrocloreto de quetamina (35mg/kg) e hidrocloreto de xilasina (5mg/kg). Os animais foram mortos por injeção endovenosa de pentobarbital sódico (40mg/kg).

## Injeção intravítrea

Imediatamente antes da injeção intravítrea, foi realizada paracentese da câmara anterior (agulha 30G) para a retirada de 0,1ml de humor aquoso para evitar aumento significativo da pressão ocular. Sob visualização direta, o olho direito de cada animal recebeu injeção intravítrea de 0,1ml de PS80 (0,4% w/v, pH 6,6-6,8, osmolaridade 288-318mOsm/kg H<sub>2</sub>O) através de agulha 30G acoplada à seringa de tuberculina. A injeção intravítrea foi realizada aproximadamente 3mm posterior ao limbo. O olho esquer-

do recebeu injeção intravítrea de solução salina estéril e foi usado como controle.

## **Exame oftalmológico**

Os animais foram submetidos à biomicroscopia e oftalmoscopia binocular indireta antes e imediatamente após as injeções intravítreas, assim como no sétimo e 14º dias após as injeções.

## **Eletrorretinograma**

Ambos os olhos foram submetidos à eletrorretinograma de campo total (ERG) antes, sete e 14 dias após a injeção intravítrea. Para a realização do ERG, foram colocadas lentes de contato acopladas a eletrodos corneanos bipolares em ambos os olhos e um eletrodoterra foi colocado na orelha do animal. Os animais foram posicionados numa gaiola de Faraday (60x60cm) e os estímulos luminosos foram gerados por um estimulador Ganzfeld controlado por um sistema computadorizado. Os sinais do ERG foram amplificados e digitalizados. Os dados foram analisados pelo programa de computador LabVIEW®. A banda dos estímulos luminosos foi calibrada para variar de 0,3 a 1.000 Hz.

O protocolo utilizado na aquisição do ERG foi o sugerido pela *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV)<sup>19</sup> e modificado para a aquisição de algumas informações adicionais que podem ser feitas em estudos experimentais. Para a obtenção de respostas escotópicas, os animais foram adaptados ao escuro por 30 minutos e foram apresentados estímulos com cinco intensidades luminosas diferentes (0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 cd.s/m<sup>2</sup>). Após dez minutos de adaptação ao claro, foram apresentados estímulos luminosos com 1cd.s/m<sup>2</sup> com iluminação de fundo de 25cd/m<sup>2</sup>.

As ondas a e b foram gravadas e suas amplitudes e tempos implícitos foram analisados. A amplitude da onda a foi medida da linha de base até a amplitude mínima registrada após a apresentação do estímulo. O tempo implícito foi medido no início do estímulo luminoso e até o pico da onda a. A amplitude da onda b foi medida do pico da onda a até o pico da onda b, e o tempo implícito da onda b correspondeu ao tempo necessário para esse pico.

O intervalo dinâmico do ERG na condição escotópica foi avaliado através do gráfico das amplitudes médias versus a intensidade do estímulo luminoso. As curvas foram obtidas através da equação de Naka-Rushton:  $V = V_{max} \cdot I^n / K^n + I^n$ , onde  $V_{max}$  representa a amplitude de saturação da onda b, I representa a intensidade do estímulo luminoso, K representa a intensidade luminosa necessária para a obtenção de 50% de  $V_{max}$  e n representa a inclinação da curva, representando o intervalo dinâmico da onda medida.

## **Análise morfológica**

Os animais foram mortos 30 dias após as injeções intravítreas e os olhos foram processados para microscopia de luz. Após a eutanásia, o segmento posterior dos olhos foi fixado em solução ALFAC. Após a inclusão em parafina, foram realizados cortes de 7µm de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina e analisados sob microscopia de luz. A espessura e a organização retinianas foram analisadas na medioperiferia inferior da retina de todos os olhos.

## **Análise estatística**

As amplitudes e os tempos implícitos foram descritos em média ± desvio padrão. Os resultados foram analisados usando o teste de análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas. O teste de Fisher foi usado como teste *post hoc* para determinar as diferenças significantes entre as médias identificadas pela ANOVA. Os parâmetros da equação de Naka-Rushton (amplitude da onda b versus intensidade do estímulo luminoso) foram inicialmente avaliados através do teste de análise de variância (ANOVA) de um e de dois fatores com a correção de Bonferroni adequada ao número de comparações entre os grupos e os intervalos. As diferenças foram consideradas significativas quando o p foi menor que 0,05.

## **RESULTADOS**

### **Achados clínicos**

Não foram encontradas alterações à biomicroscopia e à oftalmoscopia binocular indireta durante o período de acompanhamento (catarata, células nas

câmaras anterior e posterior, lesão retiniana e endoftalmite).

## Eletrorrelinograma

A figura 1 mostra traçados de ERG escotópico e fotópico de um animal antes e depois (7 e 30 dias) da injeção intravítrea de PS80 no olho direito e solução salina estéril no olho esquerdo. A inspeção visual das ondas dos ERG não sugerem alterações secundárias ao PS80 na comparação entre o dia da injeção intravítrea e o sétimo e 30º dias após a injeção.

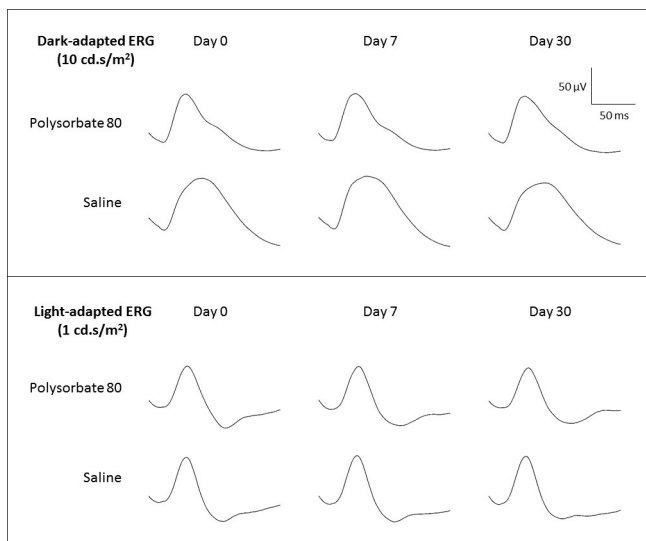


Figura 1. Traçados eletrorrelinográficos representativos.

Para avaliar o intervalo dinâmico do ERG na condição escotópica, foram feitos gráficos das amplitudes médias versus a intensidade do estímulo luminoso. A figura 2 mostra que a injeção intravítrea de PS80 não alterou o intervalo dinâmico dos ERG na comparação com a injeção de solução salina estéril. Os parâmetros obtidos das curvas ( $V_{max}$ ,  $k$  e  $n$ ) não variaram em função do tempo quando comparados os dias sete e 30 ( $p > 0,05$ ).

Os efeitos funcionais na retina da injeção intravítrea de PS80 também foi analisado através da razão  $V_{max}$  (olho experimental/olho controle) da onda b no estado escotópico e da razão da amplitude da onda b (olho experimental/olho controle) na condição fotópica. A análise dos traçados não evidencia alteração na função do sistema de cones ou de bastonetes ( $p > 0,05$ ). A figura 3 representa os achados.

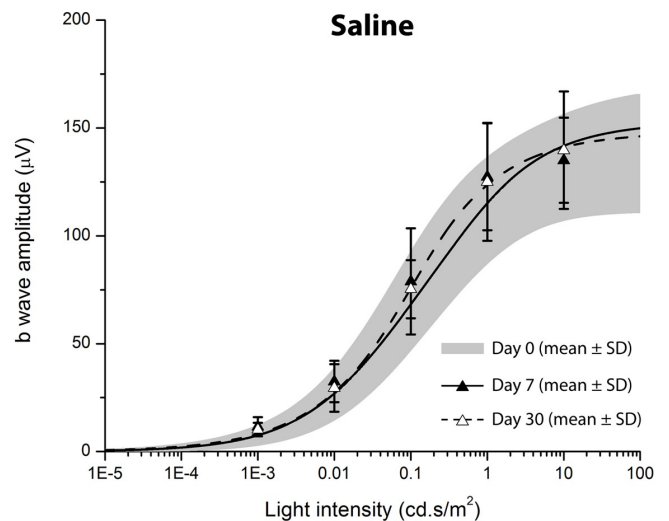
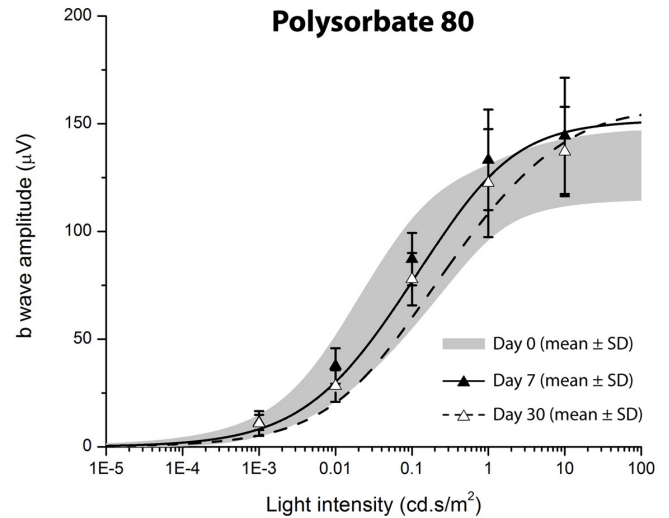


Figura 2. Amplitude da onda b escotópica x Estímulo luminoso.

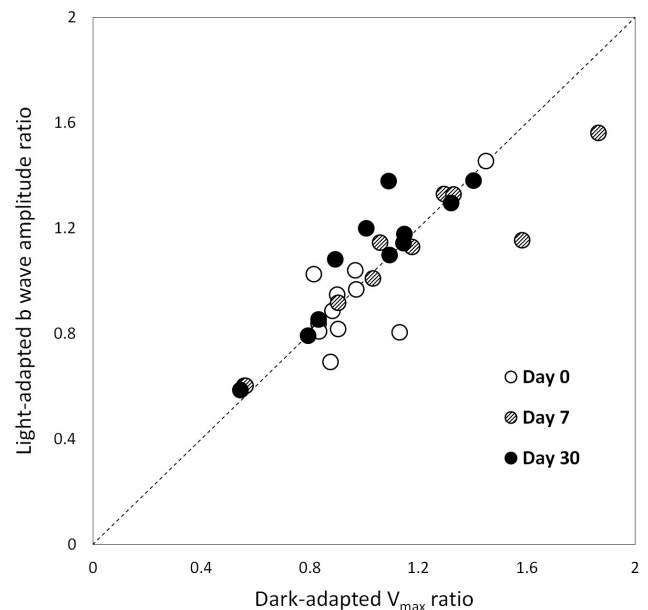


Figura 3. Razão  $V_{max}$  escotópica x Amplitude onda b fotópica.

Os traçados escotópicos e fotópicos dos ERG não foram afetados pela injeção intravítrea de PS80 nos dias zero, sete e 30, conforme sugerido pela figura 4, que mostra a relação entre a função retiniana escotópica [razão  $V_{max}$  (olho experimental/olho controle) da onda b no estado escotópico] e fotópica [razão da amplitude da onda b (olho experimental/olho controle) na condição fotópica].

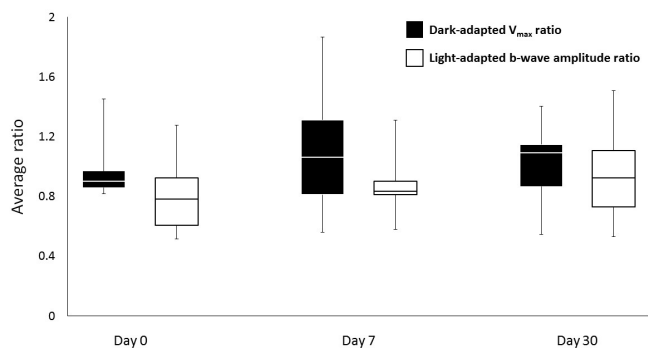


Figura 4. Função retiniana escotópica e fotópica.

Os efeitos da injeção intravítrea de PS80 na relação entre as ondas a e b também foram analisados através dos gráficos da amplitude da onda b em função da amplitude da onda a para todas as intensidades luminosas que geraram ondas a detectáveis e mensuráveis (0,1, 1 e 10 cd.s/m<sup>2</sup> na condição escotópica e 1cd.s/m<sup>2</sup> na condição fotópica). A figura 5 mostra que a injeção intravítrea de PS80 não causou alterações funcionais significativas quando comparada à injeção de solução salina estéril no sétimo e 30º dias após as injeções intravítreas em ambas as condições testadas (escotópica e fotópica).

### Histologia

A figura 6 mostra cortes histológicos representativos dos olhos direito (PS80) e esquerdo (solução salina estéril) do mesmo animal. Trinta dias após a injeção intravítrea de PS80, os olhos não apresentaram alteração histológica sob a microscopia de luz em comparação aos olhos que receberam injeção intravítrea de solução salina estéril.

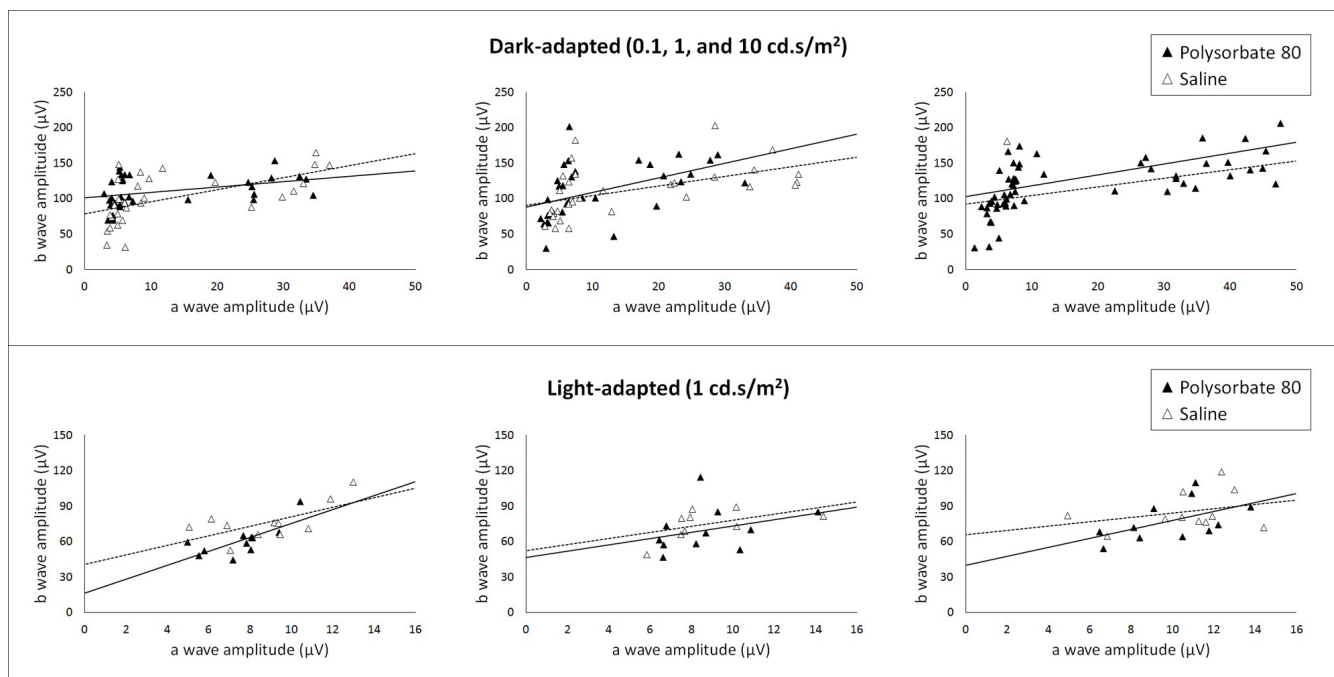


Figura 5. Amplitude onda b x onda a escotópica e fotópica.

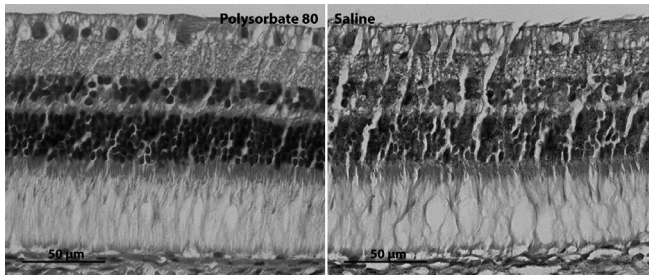


Figura 6. Histologia retiniana antes e 30 dias após PS80.

## DISCUSSÃO

Neste estudo experimental, foram avaliados os efeitos funcional e morfológico retinianos da injeção intravítrea de PS80 em coelhos. Os resultados obtidos sugerem que a concentração de PS80 utilizada neste estudo, que é a mesma utilizada na preparação das drogas para uso intravítreo para o tratamento de doenças da retina (0,4% w/v), não é tóxica para a retina dos coelhos.

O PS80 é um componente largamente utilizado na preparação de alimentos, vitaminas, medicamentos e vacinas. O PS80 estabiliza formulações aquosas de medicamentos utilizados por via endovenosa, é um agente emulsificante presente em várias drogas (amiodarona, ciclospirina e decetaxel)<sup>20</sup> e é utilizado como excipiente em vacinas<sup>21</sup>. Embora o PS80 geralmente seja considerado um componente seguro para uso sistêmico e várias drogas que o têm em suas formulações venham sendo administradas na forma de injeção intravítrea, estudos clínicos e experimentais são controversos a respeito da sua segurança nas formulações para uso intravítreo<sup>9,13-15,22</sup>. Como as formulações de drogas injetadas no vítreo contêm vários outros agentes (preservativos, surfactantes, solventes e agentes que ajustam o pH e a tonicidade), o papel de cada um desses agentes na toxicidade retiniana ainda permanece incerto<sup>16-18,23</sup>. Um dos agentes presentes nas preparações de TA injetadas no vítreo é o álcool benzílico, um agente com funções preservativa e antibacteriana. Já foi demonstrado que o álcool benzílico causa reações de contato imediatas e não imunológicas em humanos. Adicionalmente, os dados experimentais de teratogênese e toxicidade no processo reprodutivo ainda permanecem controversos<sup>24</sup>. Maia *et al.*<sup>15</sup> avaliaram as alterações clínicas e morfológicas na retina de coelhos secundárias à injeção sub-retiniana dos sobrenadantes das soluções de TA contendo ou não

álcool benzílico. Ambas as soluções testadas continham PS80 nas suas formulações. Os autores demonstraram que os olhos injetados com o sobrenadante da TA que não continha o álcool benzílico apresentou menor grau de lesão retiniana, sugerindo que a presença do álcool benzílico pode, ao menos em parte, estar relacionada aos achados de toxicidade retiniana.

Os parâmetros bioquímicos também desempenham um papel muito importante na toxicidade retiniana das drogas. A osmolaridade e o pH das soluções são fatores de alteração detectadas no ERG, oftalmoscopia binocular indireta, angiografia fluoresceínica e histologia<sup>25-28</sup>. Olhos que recebem injeções intravítreas de compostos com pH e osmolaridade não fisiológicos podem apresentar descolamento de retina<sup>27</sup>, alterações nas ondas a e b do ERG (diminuição da amplitude e aumento no tempo implícito)<sup>25-27</sup> e edema extra e intracelular<sup>25</sup>. O PS80 utilizado neste estudo é a formulação disponível comercialmente e utilizado universalmente na preparação de drogas para uso intravítreo (Tween®80). O Tween®80 tem pH muito próximo da neutralidade (6,6 a 6,8) e é isosmolar (288 a 318 mOsm/kg H<sub>2</sub>O). Portanto, é muito improvável que fatores bioquímicos associados ao PS80 utilizado neste estudo (como pH e osmolaridade) possam causar toxicidade retiniana.

Como esta é a primeira comunicação dos efeitos retinianos da injeção intravítrea de PS80, não é possível realizar uma comparação direta com outros resultados. No entanto, o PS80 está presente em várias drogas que são injetadas no vítreo de animais e os estudos não apresentam toxicidade retiniana, como *Triesence*® (uma nova formulação de TA sem preservativo que foi produzida especificamente para uso intravítreo), *Remicade*® (infliximabe)<sup>29-31</sup> e *Humira*® (adalimumabe)<sup>32-34</sup>. Estes últimos são dois anticorpos monoclonais bloqueadores do fator de necrose tumoral que são aprovados para tratamento de doenças gastrointestinais, reumáticas e dermatológicas, mas que também vêm sendo utilizados para o tratamento de uveítes autoimunes.

Este estudo apresenta algumas limitações. Apenas uma concentração de PS80 foi testada. Embora isso não nos tenha permitido determinar a dose máxima de segurança para injeções intravítreas, a concentração testada é a utilizada em todas as formulações de drogas para uso intravítreo. Além disso, não foram realizadas análises

de imuno-histoquímica ou análise ultramicroscópica para detectar alterações sutis e subclínicas de toxicidade retiniana. Por fim, este é um estudo experimental e os resultados obtidos podem não representar integralmente os eventuais achados em olhos humanos e inflamados. As limitações do uso de olhos de coelhos em estudos de toxicidade retiniana de drogas incluem diferenças de vascularização da retina em relação ao olho humano, assim como diferenças no volume dos olhos entre os olhos de coelhos e humanos. Apesar das limitações citadas, os resultados deste estudo apresentam pouca variabilidade, particularmente nos resultados do ERG, mesmo considerando que

existem vários fatores de variabilidade difíceis de controlar em estudos incluindo ERG em animais e que poderiam influenciar nos resultados<sup>35</sup>.

Este estudo sugere que o PS80, na concentração utilizada na preparação de drogas para uso intravítreo, não é tóxico para a retina de coelhos e pode ser utilizado com segurança como componente na preparação de suspensão de drogas lipofílicas. No entanto, são necessários estudos farmacológicos e de toxicidade retiniana adicionais para determinar a segurança do PS80 em múltiplas injeções intravítreas no mesmo olho, uma vez que essa é uma condição muito comum na prática clínica.

## A B S T R A C T

**Objective:** to determine the functional and morphological effects at rabbits retina of PS80 concentration used in the preparation of intravitreal drugs. **Methods:** eleven New Zealand rabbits received a intravitreal injection of 0.1ml of PS80. As control, the contralateral eye of each rabbit received the same volume of saline. Electroretinography was performed according to a modified protocol, as well as biomicroscopy and retina mapping before injection and seven and ten days after. Animals were euthanized in the 30th day and the retinas were analyzed by light microscopy. **Results:** eyes injected with PS80 did not present clinical signs of intraocular inflammation. Electroretinography did not show any alteration of extent and implicit time of a and b waves at scotopic and photopic conditions. There were no morphological alterations of retinas at light microscopy. **Conclusion:** intravitreal injection of PS80 in the used concentration for intravitreal drug preparations do not cause any functional or morphological alterations of rabbit retinas. These results suggest that PS80 is not toxic to rabbit retinas and may be safely used in the preparation of new lipophilic drugs for intravitreal injection.

**Keywords:** Polysorbates. Retina. Electroretinography. Intravitreal Injections. Morphological and Microscopic Findings.

## REFERÊNCIAS

1. Rodrigues EB, Maia M, Penha FM, Dib E, Bordon AF, Magalhães Júnior O, et al. [Technique of intravitreal drug injection for therapy of vitreoretinal diseases]. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71(6):902-7. Portuguese.
2. Fialho SL, Cunha Júnior Ada S. [Drug delivery systems for the posterior segment of the eye: fundamental basis and applications]. *Arq Bras Oftalmol.* 2007;70(1):173-9. Portuguese.
3. Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. *Reprod Toxicol.* 2008;25(1):89-99.
4. Thackaberry EA, Kopytek S, Sherratt P, Trouba K, McIntyre B. Comprehensive investigation of hydroxypropyl methylcellulose, propylene glycol, polysorbate 80, and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for use in general toxicology studies. *Toxicol Sci.* 2010;117(2):485-92.
5. Gajdová M, Jakubovsky J, Války J. Delayed effects of neonatal exposure to Tween 80 on female reproductive organs in rats. *Food Chem Toxicol.* 1993;31(3):183-90.
6. Coors EA, Seybold H, Merk HF, Mahler V. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005;95(6):593-9.
7. Younis HS, Shower M, Palacio K, Gukasyan HJ, Stevens GJ, Eving W. An assessment of the ocular safety of inactive excipients following sub-tenon injection in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008;24(2):206-16.
8. Onizuka N, Uematsu M, Kusano M, Sasaki H, Suzuma K, Kitaoka T. Influence of different additives and their concentrations on corneal toxicity and antimicrobial effect of benzalkonium chloride. *Cornea.* 2014;33(5):521-6.
9. Ayaki M, Yaguchi S, Iwasawa A, Koide R. Cytotoxicity of ophthalmic solutions with and without preservatives to human corneal endothelial cells, epithelial cells

- and conjunctival epithelial cells. *Clin Exp Ophthalmol*. 2008;36(6):553-9.
10. Ruiz-Moreno JM, Montero JA, Bayon A, Rueda J, Vidal M. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide at high doses in the rabbit. *Exp Eye Res*. 2007;84(2):342-8.
  11. Oliveira RC, Messias A, Siqueira RC, Bonini-Filho MA, Haddad A, Damico FM, et al. Vitreous pharmacokinetics and retinal safety of intravitreal preserved versus non-preserved triamcinolone acetonide in rabbit eyes. *Curr Eye Res*. 2012;37(1):55-61.
  12. Ye YF, Gao YF, Xie HT, Wang HJ. Pharmacokinetics and retinal toxicity of various doses of intravitreal triamcinolone acetonide in rabbits. *Mol Vis*. 2014;20:629-36.
  13. Kai W, Yanrong J, Xiaoxin L. Vehicle of triamcinolone acetonide is associated with retinal toxicity and transient increase of lens density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(9):1152-9.
  14. Kozak I, Cheng L, Mendez T, Davidson MC, Freeman WR. Evaluation of the toxicity of subretinal triamcinolone acetonide in the rabbit. *Retina*. 2006;26(7):811-7.
  15. Maia M, Penha FM, Farah ME, Dib E, Príncipe A, Lima Filho AA, et al. Subretinal injection of preservative-free triamcinolone acetonide and supernatant vehicle in rabbits: an electron microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(3):379-88.
  16. Morrison VL, Koh HJ, Cheng L, Bessho K, Davidson MC, Freeman WR. Intravitreal toxicity of the kenalog vehicle (benzyl alcohol) in rabbits. *Retina*. 2006;26(3):339-44.
  17. Chang YS, Wu CL, Tseng SH, Kuo PY, Tseng SY. In vitro benzyl alcohol cytotoxicity: implications for intravitreal use of triamcinolone acetonide. *Exp Eye Res*. 2008;86(6):942-50.
  18. Li Q, Wang J, Yang L, Mo B, Zeng H, Wang N, Liu W. A morphologic study of retinal toxicity induced by triamcinolone acetonide vehicles in rabbit eyes. *Retina*. 2008;28(3):504-10.
  19. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M; International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol*. 2009;118(1):69-77.
  20. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res*. 2004;21(2):201-30.
  21. Fox CB, Haensler J. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(7):747-58.
  22. Zhengyu S, Fang W, Ying F. Vehicle used for triamcinolone acetonide is toxic to ocular tissues of the pigmented rabbit. *Curr Eye Res*. 2009;34(9):769-76.
  23. Patel S, Barnett JM, Kim SJ. Retinal toxicity of intravitreal polyethylene glycol 400. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016;32(2):97-101.
  24. Nair B. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *Int J Toxicol*. 2001;20 Suppl 3:23-50.
  25. Maia M, Margalit E, Lakhanpal R, Tso MO, Grebe R, Torres G, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina*. 2004;24(1):69-79.
  26. Liang C, Peyman GA, Sun G. Toxicity of intraocular lidocaine and bupivacaine. *Am J Ophthalmol*. 1998;125(2):191-6.
  27. Marmor MF. Retinal detachment from hyperosmotic intravitreal injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979;18(12):1237-44.
  28. Verstraeten TC, Chapman C, Hartzler M, Winkler BS, Trese MT, Williams GA. Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit. *Arch Ophthalmol*. 1993;111(6):849-54.
  29. Giansanti F, Ramazzotti M, Vannozzi L, Rapizzi E, Fiore T, Iaccheri B, et al. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(3):1151-6.
  30. Theodossiadis PG, Liarakos VS, Sfikakis PP, Charonis A, Agrogiannis G, Kavantzias N, et al. Intravitreal administration of the anti-TNF monoclonal antibody infliximab in the rabbit. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(2):273-81.
  31. Giansanti F, Papucci L, Capaccioli S, Bacherini D, Vannozzi L, Witort E, et al. Ocular safety of infliximab in rabbit and cell culture models. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2010;26(1):65-71.
  32. Manzano RP, Peyman GA, Carvounis PE, Kivilcim



- M, Khan P, Chevez-Barrios P, et al. Ocular toxicity of intravitreal adalimumab (Humira) in the rabbit. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(6):907-11.
33. Manzano RP, Peyman GA, Carvounis PE, Damico FM, Aguiar RG, Ioshimoto GL, et al. Toxicity of high-dose intravitreal adalimumab (Humira) in the rabbit. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2011;27(4):327-31.
34. Myers AC, Ghosh F, Andréasson S, Ponjavic V. Retinal function and morphology in the rabbit eye after intravitreal injection of the TNF alpha inhibitor adalimumab. *Curr Eye Res*. 2014;39(11):1106-16.
35. Perlman I. Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques. *Doc Ophthalmol*. 2009;118(1):3-28.
- Recebido em: 30/07/2017  
Aceito para publicação em: 23/08/2017  
Conflito de interesse: nenhum.  
Fonte de financiamento: FAPESP 2007/02696-1 FAPESP 2007/56624-1 FAPESP 2014/26818-2 CNPq 150614/2009-8.
- Endereço para correspondência:**  
Francisco Max Damico  
E-mail: fmdamico@usp.br / fmdamico@yahoo.com