

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas

Prevenção de rejeição em transplantes de córnea de  
alto risco com tacrolimus 0,03% colírio

*Dissertação de Mestrado*

**Otávio de Azevedo Magalhães**

Orientadora: Profa. Dra. Diane Ruschel Marinho

2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Magalhães, Otávio de Azevedo

Prevenção de rejeição em transplantes de córnea de alto risco com tacrolimus 0,03% colírio / Otávio de Azevedo Magalhães. -- 2013.

49 f.

Orientadora: Diane Ruschel Marinho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Transplante. 2. Córnea. 3. Rejeição. 4. Tacrolimus. 5. Imunossupressão. I. Marinho, Diane Ruschel, orient. II. Título.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas

Prevenção de rejeição em transplantes de córnea de  
alto risco com tacrolimus 0,03% colírio

*Dissertação de Mestrado*

**Otávio de Azevedo Magalhães**

Orientadora: Profa. Dra. Diane Ruschel Marinho

2013



## Dedicatória

Dedico este estudo a todos os pacientes que perderam a visão em idade ativa e às equipes dos bancos de olhos que tanto se esforçam para diminuir esse sofrimento.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, José Antônio e Vera Magalhães, e minha noiva, Vanessa Preto de Oliveira, pelo apoio e incentivo durante todo este período, o qual me proporcionou importante crescimento pessoal.

Agradeço à minha orientadora, Professora Diane Ruschel Marinho, pela sabedoria transmitida, permitindo a realização dessa dissertação com confiança e tranquilidade.

Ao Dr. Sérgio Kwitko, obrigado pelos apontamentos que engrandeceram este trabalho.

Muito obrigado à bióloga Claudete Locatelli pela sua organização ímpar e ao funcionário Roberto Lisboa Baptista pela presteza e agilidade.

Ao colega Dr. Maicon Falavigna, obrigado pelo poder de simplificação.

Ao Professor Samuel Rymer, agradeço os valiosos conselhos.

Agradeço todos os médicos residentes do Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que com o seu trabalho diário ajudaram a avaliar as bases dessa dissertação.

Aos pacientes, parte fundamental desse estudo, muito obrigado por sua contribuição à ciência.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro.

“O trabalho dignifica o homem”

*Benjamin Franklin*

## Índice Geral

Introdução.....	8
Revisão da Literatura.....	10
Referências.....	13
Objetivos.....	19
Artigo Científico – língua inglesa.....	20
Anexo.....	35
Artigo Científico – língua portuguesa.....	36

## Introdução

O transplante de córnea é realizado há mais de 100 anos e apresenta resultados muito positivos, tanto na sua taxa de sobrevida quanto no seu desfecho visual.<sup>1</sup> Em 2012, 15.281 ceratoplastias foram realizadas no Brasil, segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos.<sup>2</sup> A maioria desses procedimentos acontecem como primeiro transplante em receptores de baixo risco, incluindo pacientes com ceratocone e ceratopatia bolhosa. Estas condições apresentam sucesso pós-operatório acima de 90% em 2 anos.<sup>3</sup> A menor parcela das indicações de transplante representa o maior desafio imunológico: baixa idade do receptor, história prévia de rejeição, córneas vascularizadas,<sup>4</sup> ceratite pelo vírus *Herpes simplex* (HSV)<sup>5</sup> e queimadura química.<sup>6-7</sup> O diâmetro da trepanação da córnea receptora também parece influenciar na incidência de rejeição, como mostrou com significância estatística o estudo de *Epstein et al.*<sup>6</sup> Trepanações acima de 8,25 mm apresentaram uma chance de quase 6 vezes maior no risco de rejeição em relação às de menor diâmetro.<sup>8</sup> A explicação teórica para esse aumento no risco é a maior proximidade da córnea doada ao limbo do receptor com seus vasos linfáticos e sanguíneos. Apesar dos avanços na terapia anti-inflamatória e anti-glaucomatosa, em técnicas cirúrgicas e cuidados pós-operatórios, a incidência de rejeição permanece elevada neste grupo de pacientes.<sup>9</sup>

Os indivíduos de alto risco para rejeição perderam seu "privilegio imunológico", termo utilizado devido à falta de vasos sanguíneos e linfáticos na córnea, pequena quantidade de células apresentadoras de antígenos e menor expressão de antígenos MHC de classe II. O desvio imunomodulatório no segmento anterior do olho é conhecido pela sigla ACAID (*Anterior Chamber Associated Immune Deviation*).<sup>10</sup> O reconhecimento de antígenos heterólogos ativa os linfócitos T imaturos, que proliferam e sofrem expansão clonal. Esta expansão é promovida sob a influência da interleucina 2 (IL-2).<sup>11</sup> As drogas bloqueadoras de calcineurina, como a ciclosporina A (CsA) e o tacrolimus (FK506) atuam ao inibir a expansão clonal dos linfócitos T através da ligação de proteínas intracelulares chamadas imunofilinas.<sup>11</sup> Os sinais de um episódio de rejeição foram caracterizados pela presença de edema de córnea súbito com linha epitelial ou endotelial, infiltrados subepiteliais, reação de câmara anterior leve à moderada ou precipitados ceráticos. Se o edema de córnea se torna

persistente e há perda da transparência após 2 meses de tratamento, a rejeição é considerada irreversível (falência secundária). Neste ponto, a única indicação possível para restaurar a função visual seria um novo transplante de córnea ou ceratoprótese.

Os corticóides tópicos são os agentes tradicionalmente prescritos em todos os pacientes submetidos à transplante, tanto para evitar como para tratar a rejeição, porém seu uso crônico apresenta diversos efeitos adversos.<sup>12</sup> Alternativas estão sendo cada vez mais estudadas, como o colírio de CsA na concentração de 0,5% e 2%, escolhido por grande parte dos oftalmologistas que realizaram transplantes em situação de alto risco.<sup>12</sup> Contudo, trabalhos recentes questionam seu caráter imunossupressor quando comparado ao tratamento tradicional com colírio de prednisolona 1%.<sup>13-14</sup>

A abordagem sistêmica também é alvo de pesquisa em imunossupressão. Ciclosporina A,<sup>15</sup> micofenolato mofetil,<sup>16</sup> tacrolimus<sup>17</sup> e azatioprina<sup>16</sup> via oral foram estudados e mostraram discreta vantagem na prevenção da rejeição. O que mais chamou a atenção nesses estudos foi a variedade de efeitos sistêmicos adversos.

Outra estratégia, motivo de estudo para redução do risco de rejeição, é a compatibilidade ABO e HLA. Os resultados são controversos.<sup>18</sup> Em relação aos transplantes de baixo risco, é bem estabelecido que a compatibilidade ABO e HLA não mostraram redução no risco de rejeição em ensaios clínicos<sup>19-20</sup>. Nos pacientes de alto risco, por sua vez, há discordância em relação aos resultados encontrados. Apesar de ser realizada por alguns centros, a maioria dos oftalmologistas e imunologistas não concordam com esta medida.<sup>21</sup>

## Revisão da literatura

Os transplantes de córnea em pacientes de alto risco representam um imenso desafio para os oftalmologistas. A falência destes enxertos chega a 80% em 5 anos em alguns estudos.<sup>19</sup> Inúmeras medidas preventivas já foram estudadas para evitar a rejeição imunológica, mas até o presente momento não há um consenso sobre o tema.

O pareamento HLA apresenta resultados controversos em transplantes de alto-risco.<sup>22</sup> *Khairedd R et al* mostraram, em uma pesquisa com 151 pacientes de alto risco, que a quantidade de antígenos HLA compatíveis está diretamente correlacionada à sobrevida do enxerto doado.<sup>23</sup> O *Collaborative Corneal Transplantation Study* (CCTS) contudo falhou em demonstrar correlação entre a compatibilidade HLA e a redução da falência dos transplantes.<sup>3</sup> Os autores do CCTS concluíram que tanto pacientes compatíveis HLA-A e HLA-B, como HLA-DR demonstraram o mesmo índice de rejeição daqueles que somente utilizaram imunossupressão tópica. Os autores alemães do estudo acima criticam a reprodutibilidade dessa pesquisa e questionam os métodos de identificação do alelos HLA.

A compatibilidade dos grupos sanguíneos ABO também não é consenso entre os oftalmologistas. Em um estudo com 140 córneas vascularizadas, pesquisadores canadenses não encontraram aumento na sobrevida desses enxertos em pacientes compatíveis.<sup>24</sup> Em estudo mais recente, *Ardjomand et al.* encontraram ceratócitos e células endoteliais que expressam os antígenos A e B, propondo um possível papel desses nos episódios de rejeição imunomediada.<sup>25</sup> Não há, entretanto, reprodução clínica desses achados.

Dessa forma, todos os autores concordam que a compatibilidade ABO e HLA não podem substituir a imunossupressão tópica na prevenção do quadro de rejeição.

A administração rotineira de medicação sistêmica em transplantes de córnea de alto risco foi relatada em questionário por apenas 17% dos oftalmologistas americanos no ano de 2004.<sup>12</sup> Destes cirurgiões, 90% utilizavam ciclosporina A via oral e 10% tacrolimus também por esta via. Em um ensaio clínico, *Rumelt et al*<sup>18</sup> encontrou 32% de casos de rejeição irreversível em usuários de ciclosporina sistêmica em comparação aos 42% do grupo controle que não recebeu essa medicação. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Apesar de outros estudos como o de *Hill*<sup>19</sup> demonstrarem bons resultados, encontrou-se diversos efeitos adversos com o uso de imunossupressores sistêmicos.<sup>20</sup> Da mesma forma,

em uma série de casos não-controlados com 23 transplantes de alto risco o uso do tacrolimus sistêmico preveniu a rejeição, contudo mais de 30% descontinuaram a medicação pelo mesmos motivos.<sup>26</sup> Além dessas medicações, 44% dos oftalmologistas do Reino Unido fazem imunossupressão oral com Azatioprina. Novas drogas continuam sendo testadas, como o sirolimus (também um macrolídeo) juntamente ao micofenolato mofetil (inibidor da síntese das purinas).<sup>27</sup> Com essa combinação, *Chatel et al* relataram a manutenção da transparência por 3 anos em 5 dos 6 transplantes de alto-risco realizados. A maior limitação ao uso dessas medicações é a sua toxicidade sistêmica.<sup>28</sup> Vários efeitos adversos foram relatados: hipertensão, hiperlipidemia, fibrose pulmonar, nefrotoxicidade e linfopenia. Percebe-se que estes estudos apresentam período curto de seguimento, critérios de definição de “transplante de alto risco” discutíveis e número de pacientes limitados. Por isso, não há um protocolo seguro e eficiente para a prevenção de rejeição imunológica em pacientes de alto risco que envolva imunossupressão sistêmica.

Para evitar os efeitos deletérios das medicações sistêmicas, *Zhao et al* avaliaram o tratamento da ciclosporina A tópica na concentração de 0,5% no tratamento da rejeição refratária ao tratamento convencional.<sup>29</sup> De 16 olhos, 9 enxertos tornaram-se transparentes. Esse estudo não apresentava longo seguimento nem grupo controle. Recentemente, em ensaio clínico randomizado, *Sinha et al* estudaram 39 olhos tratados com ciclosporina A na concentração de 2% mais prednisolona tópica, com 39 olhos que utilizaram a mesma prednisolona com placebo. Esse estudo bem controlado não demonstrou a prevenção de rejeição em pacientes de alto risco que utilizaram imunossupressão adicional de ciclosporina A colírio na concentração de 2%.<sup>30</sup>

Os corticosteroides tópicos são eficientes tanto na prevenção como no tratamento da rejeição imunológica.<sup>31</sup> Sua principal forma de imunossupressão é pelo bloqueio da migração de leucócitos para a córnea, inibindo a ativação de células T através da ação na síntese de interleucina 2 (IL-2).<sup>32</sup> Todos os pacientes submetidos a transplante de córnea são submetidos a essa medicação por no mínimo de 6 meses de acordo com diversos protocolos.<sup>33-34</sup> Acetato de prednisolona a 1% é a droga tópica mais utilizada, apresentando ótimos resultados em pacientes de baixo risco para rejeição.<sup>35</sup>

O tacrolimus (previamente chamado FK506) é um macrolídeo natural extraído de

uma bactéria “fungo-like” chamada *Streptomyces tsukubaensis* originalmente isolado no Japão na década de 80.<sup>36</sup> Na década seguinte, a apresentação via oral foi lançada, seguida alguns anos mais tarde (1999) do uso tópico para o tratamento da dermatite atópica. Com a expansão do seu uso e o seu sucesso na prevenção de rejeição dos transplantes de rim e fígado, iniciou-se no começo desse século a aplicação de tacrolimus sistêmico em transplantes de córnea de alto risco. Na concentração de 0,05% foi estudado quanto à sua distribuição e estabilidade *in vivo*, apresentando boa distribuição no humor aquoso e não demonstrando efeito sistêmico ou de acúmulo na câmara anterior.<sup>37</sup> No mesmo estudo, a córnea demonstrou altos valores de FK506 sem ser detectado na corrente sanguínea. Em doenças alérgicas graves, como a ceratoconjuntive vernal e atópica, o colírio de tacrolimus nas concentrações de 0,02%, 0,03% e 0,1% (duas vezes ao dia) foi pesquisado.<sup>38-39</sup> Provou diminuir seus sinais e sintomas em casos refratários a antialérgicos tópicos e corticosteroides em ensaios clínicos randomizados.<sup>40</sup>

Ainda há dúvidas sobre a tolerância do colírio de tacrolimus. Devido a sua característica química lipofílica, o FK506 apresenta dificuldade de ser composto na formulação tópica.<sup>41</sup> Por isso, muitos veículos são propostos para sua administração, como o óleo de castor e de oliva, dextrina e ácido láctico-co-glicólico.<sup>42-43</sup> No Brasil, o tacrolimus colírio é diluído em azeite de oliva estéril (Ophthalmos Pharma, São Paulo, Brasil) e manipulado na concentração de 0,03%, apresentando relatos de boa tolerância.<sup>44</sup>

A introdução do colírio de tacrolimus na concentração de 0,03% em nosso serviço iniciou-se no final do ano de 2008, motivado pelo relato de casos publicado por *Dhaliwal et al*,<sup>45</sup> que descreveram a eficácia do colírio de tacrolimus na prevenção de novos episódios de rejeição em 4 pacientes com transplantes de alto risco por 4 anos. Identificamos a falta de estudos controlados avaliando o uso do tacrolimus tópico em transplantes bem selecionados como de alto risco para rejeição.

## Referências

1. George AJ, Larkin DF. Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am J Transplant* 2004; 4:678–685.
2. RBT – Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XVIII No. 4. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2012/rbt2012-parciall.pdf>
3. The Collaborative Corneal Transplantation Studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110:1392-1403
4. Niederkorn JY. High-risk corneal allografts and why they lose their immune privilege. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010; 10(5):493-7
5. Larkin DF. Corneal transplantation for herpes simplex keratitis. *Br J Ophthalmol*. 1998 Feb;82:107-8.
6. Feng CM, Chen JQ, Li YP. Factors of graft failure after chemical corneal injury. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 1994 Jul;30:277-9.
7. Boisjoly HM, Bernard PM, Dube I, *et al*. Effect of factors unrelated to tissue matching on corneal transplant endothelial rejection. *Am J Ophthalmol*. 1989 Jun 15;107:647-54.
8. Epstein AJ, de Castro TN, Laibson PR, *et al*. Risk factors for the first episode of corneal graft rejection in keratoconus. *Cornea*. 2006;25:1005–1011.
9. Patel NP, Kim T, Rapuano CJ, Cohen EJ, Laibson PR. Indications for and outcomes of repeat penetrating keratoplasty 1989-1995. *Ophthalmology* 2000; 107:719-724.

10. Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(12):2485-94.
11. Coster DJ, Williams KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(6):1112-22.
12. Randleman JB, Stulting RD. Prevention and treatment of corneal graft rejection: current practice patterns. *Cornea* 2006;25(3):286-290.
13. Ebihara N, Ohtomo K, Tokura T, Ushio H, Murakami A. Effect of Tacrolimus on Chemokine Production by Corneal Myofibroblasts via Toll-Like Receptors, Compared With Cyclosporine and Dexamethasone. *Cornea* 2011 Jun;30(6):702-8
14. Price MO, Price F. Efficacy of topical Cyclosporine 0,05% for prevention of cornea transplant rejection episodes *Ophthalmology* 2006 113(10) 1786-1790.
15. Young AL; Rao SK; Cheng LL; Wong AK; Leung AT; Lam DS. Combined intravenous pulse methylprednisolone and oral cyclosporine A in the treatment of corneal graft rejection: 5-year experience. *Eye*. 2002;16(3):304-8.
16. Reis A; Reinhard T; Voiculescu A; Kutkuhn B; Godehardt E; Spelsberg H; Althaus C; Sundmacher R. Mycophenolate mofetil versus cyclosporin A in high risk keratoplasty patients: a prospectively randomised clinical trial. *Br J Ophthalmol*.1999; 83(11):1268-71.
17. Joseph A, Raj D, Shanmuganathan V, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus immunosuppression in high-risk corneal grafts. *Br J Ophthalmol* 2007; 91(1): 51-55.
18. Rumelt S, Bersudsky V, Blum-Hareuveni T, et al. Systemic cyclosporin A in high failure risk, repeated corneal transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:988–992.

19. Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty. Short- versus long-term therapy. *Ophthalmology*. 1994;101:128–133.
20. Weisbrod DJ, Sit M, Naor J, Slomovic AR. Outcomes of repeat penetrating keratoplasty and risk factors for graft failure. *Cornea* 2003 22(5); 429-434.
21. Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology* 1994;10(1)1536-47.
22. Maguire MG, Stark WJ, Gottsch JD, et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Ophthalmology* 1994;10(1)1536-47.
23. Khairuddin R, Wachtlin J, Hopfenmüller W, Hoffmann F. HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241;12:1020-8.
24. Roy R, Des Marchais B, Bazin R, Boisjoly HM, Dube I, Laughrea PA. Role of ABO and Lewis blood group antigens in donor-recipient compatibility of corneal transplantation rejection. *Ophthalmology* 1997;104:508–512
25. Ardjomand N, Komericki P, Klein A, et al. ABO blood group expression in corneal allograft failures *Ophthalmologie* 2005 102;10:981-6.
26. Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus (FK506) in the management of high-risk corneal and limbal grafts. *Ophthalmology*. 2001;108:1838–1844.
27. Chatel MA, Larkin DF. Sirolimus and Mycophenolate as combination prophylaxis in corneal transplant recipients at high rejection risk. *Am J Ophthalmol*. 2010 150;2:1797-884.

28. Poon AC, Forbes JE, Dart JK et al. Systemic cyclosporine A in high-risk penetrating keratoplasties: a case-control study. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1464-69.
29. Zhao JC, Jin XY. Local therapy of corneal allograft rejection with cyclosporine. *Am J Ophthalmol* 1995;119:189-194.
30. Sinha R, Jhanji V, Verma K, et al. Efficacy of topical cyclosporine A 2% in prevention of graft rejection in high-risk keratoplasty: a randomized controlled trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:1167-72.
31. Barshes NR, Goodpastor SE, Goss JA. Pharmacologic immunosuppression. *Front Biosci* 2004;9:411–20.
32. Paliogianni F, Kincaid RL, Boumpas DT. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP elevating agents inhibit interleukin 2 gene transcription by counteracting calcineurin-dependent pathways. *J Exp Med* 1993;178:1813–17.
33. Rinne JR, Stulting RD. Current practices in the prevention and treatment of corneal graft rejection. *Cornea* 1992;11:326–328.
34. Barker NH, Henderson TR, Ross CA, et al. Current Australian practice in the prevention and management of corneal allograft rejection. *Clin Exp Ophthalmol* 2000;28:357–360.
35. Koay PY, Lee WH, Figueiredo FC. Opinions on risk factors and management of corneal graft rejection in the United Kingdom. *Cornea* 2005;24:292–296.
36. Kiko T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987;40:1256-65.

37. Yuan J, Zhai J, Chen J, Ye C, Zhou S. Preparation of 0,05% FK506 Suspension Eyedrops and Its Pharmacokinetics After Topical Ocular Administration. *Jour of Ocul Pharmacol and Therap* 2009;25(4):345-350.
38. Joseph, MA, Kaufman, HE, Insler, M. Topical tacrolimus ointment for treatment of refractory anterior segment inflam- matory disorders. *Cornea*. 2005;24:417–20.
39. Miyazaki, D., Tominaga, T., Kakimaru-Hasegawa, A., et al. Therapeutic effects of tacrolimus ointment for refractory ocular surface inflammatory diseases. *Ophthalmology* 2008;115:988–992.e5,.
40. Ohashi Y, Ebihara N, Fujishima H, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Tacrolimus Ophthalmic Suspension 0.1% in Severe Allergic Conjunctivitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2010;26:165–174.
41. Pleyer U, Lutz S, Juske WJ, et al. Ocular absorption of topically applied FK506 from liposomal and oil formulations in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2737-42.
42. Yura H, Yoshimura N, Hamashima T, et al. Synthesis and pharmacokinetics of a novel macromolecular prodrug of tacrolimus (FK506), FK-dextran conjugate. *J Control Release* 1999;57(1):87-99.
43. Fei WL, Chen JQ, Yuan J, et al. Preliminary study of the effect of FK506 nanospheric-suspension eye drops on rejection of penetrating keratoplasty. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008;24:235-44.
44. Moscovici BK, Holzchuh R, Chiacchio BB, et al. Clinical treatment of dry eye using 0.03% tacrolimus eye drops. *Cornea* 2012;31(8):945-9.

45. Dhaliwal JS, Mason BF, Kaufman SC. Long-term Use of Topical Tacrolimus (FK506) in High-risk Penetrating Keratoplasty. *Cornea* 2008;27(4):488-93.

## **Objetivos**

O objetivo desta pesquisa é comparar retrospectivamente a eficácia do colírio de tacrolimus na concentração de 0,03% juntamente à prednisolona 1% tópica, ao uso da prednisolona 1% tópica em monoterapia na prevenção da rejeição imunológica em pacientes submetidos à ceratoplastia penetrante de alto risco.

Secundariamente, observou-se a segurança desta medicação através da medida da pressão intra-ocular (PIO) nestes pacientes.

## Artigo Científico Original – Língua Inglesa

### **Topical 0.03% tacrolimus preventing rejection in high-risk corneal transplantation: a cohort study**

Otavio A. Magalhaes<sup>1</sup>, MD; Diane R. Marinho<sup>2</sup>, PhD; Sergio Kwitko<sup>2</sup>, PhD

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors

No competing interests exist for any author of this study.

Dr. Otavio Azevedo Magalhaes contributed to conception and design, acquisition of data and analysis, interpretation of data, drafting the article and revising it critically, and final approval of the version to be published.

Prof. Diane Marinho contributed to conception and design, analysis and interpretation of data, revising it critically, and final approval of the version to be published.

Dr. Sergio Kwitko contributed to conception and design, analysis and interpretation of data; revising it critically; and final approval of the version to be published.

Correspondence and reprint requests to Otavio Magalhaes, 333 Mostardeiro st, office 503, Porto Alegre, RS 90430-001, Brazil. E-mail: otaviomaga@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Corresponding author. Surgery Postgraduate Program - Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Department of Ophthalmology, Clinical Hospital of Porto Alegre.

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Clinical Hospital of Porto Alegre, Brazil

## **Abstract**

### Background/aims

The present study aims to identify the rate of rejection and safety of 0.03% tacrolimus eye drops associated with 1% prednisolone in a topical formulation, comparing them to the use of 1% prednisolone eye drops alone in patients with high-risk corneal transplantation.

### Methods

Retrospective cohort study with 72 patients (72 eyes) who underwent more than one penetrating keratoplasty (PK) in the same eye or had severe chemical burn between 2004 and 2011 in the department of cornea and external disease of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Brazil. We compared the records of 36 patients that performed unilateral PK and received only 1% prednisolone eye drops between May 2004 and July 2008, with 36 patients that received 0.03% tacrolimus eye drops in addition to 1% prednisolone between August 2008 and August 2011.

### Results

The mean follow-up of the group exposed to tacrolimus was 23.1 months and 24.0 in the prednisolone alone group. The demographics, intraoperative and initial indications for first PK were similar between groups, as well as the number of re-grafts performed. Intraocular pressure (IOP) was not statistically different among groups. Regarding irreversible rejections, topical tacrolimus showed greater protection: only 7 grafts (19.4%) lost transparency against 16 (44.4%) in the 1% prednisolone alone group ( $p < 0,05$ ).

### Conclusion

Topical 0.03% tacrolimus was effective in preventing irreversible rejection in patients with high-risk corneal transplantation without increasing IOP.

## Introduction

Corneal transplantation has been performed for more than 100 years with a graft survival rate of approximately 75% in 5 years.<sup>1</sup> In 2011, 14,696 corneal grafts were performed in Brazil according to the Brazilian Association of Organ Transplants.<sup>2</sup> Most of these grafts happen as first transplant in low-risk recipients, including patients with keratoconus and bullous keratopathy. These conditions show a success rate above 90% in 2 years.<sup>3</sup> Major challenge occurs in chemical burns, autoimmune diseases, previous history of rejection and vascularized corneas.<sup>4</sup> Other risk factors for rejection include herpes simplex virus (HSV) keratitis,<sup>5</sup> chemical burn,<sup>6</sup> and corneal trephination diameter exceeding 8.25 mm.<sup>7-8</sup> Despite advances in anti-inflammatory therapy, glaucoma, surgical techniques and postoperative care, rejection rates remain high in this group of patients.<sup>9</sup>

Tacrolimus (also named FK506) and cyclosporine (CsA) are calcineurin-blocking drugs that inhibit clonal expansion of T lymphocytes through binding of intracellular proteins called immunophilins.<sup>10</sup>

Topical corticosteroids are the agents traditionally prescribed for all patients undergoing transplantation both to prevent and treat rejection, although its use presents several chronic side effects.<sup>11</sup> There is no consensus regarding rejection prevention of high-risk recipients. Among the pharmacological alternatives to decrease this risk, corticosteroids associated with the use of systemic immunosuppressant or, more recently, topical 0.5% and 2% cyclosporine A are options available for ophthalmologists.<sup>12</sup> Despite its apparent benefit, there is no scientific evidence that any medication is superior to traditional treatment with topical 1% prednisolone.<sup>12-13</sup> Systemic approach is also subject of research, with varying results and uncertain benefits, due to the significant incidence of side events.<sup>14-22</sup>

Almost twenty years ago, an experimental study in rabbits demonstrated significant efficacy of topical 0.3 mg/ml tacrolimus in preventing allograft rejection in experimental corneal transplantation.<sup>23</sup> Recent case report with tacrolimus eye drops demonstrated good safety and tolerability, preventing new episodes of rejection in 4 high-risk transplants when associated with topical steroids.<sup>24</sup> The available research has low level of evidence and no control group in humans. Our study evaluates the rate of rejection and safety of tacrolimus

associated with prednisolone (both in a topical formulation), comparing them to the use of topical prednisolone alone in patients at high-risk for graft rejection.

## **Methods**

The study was approved by the ethics committee of the *Clinical Hospital of Porto Alegre, Brazil* (protocol number 11-0432) and conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

All data entered here followed the recommendation on observational studies (STROBE).<sup>25</sup>

We conducted a retrospective cohort study that evaluated the records of patients considered high-risk for rejection who underwent unilateral penetrating keratoplasty (PK) in the cornea department of our hospital. All procedures were performed in our centre with the same technique (interrupted sutures) and undertaken by different surgeons. Corneas were stored in Optisol-GS® solution. Our objective was to assess the clinical outcome of patients treated with sterile olive oil diluted 0.03% tacrolimus monohydrate eye drops (Ophthalmos Pharma; *Sao Paulo, Brazil*) concurrently with the use of 1% prednisolone, comparing them to 1% prednisolone eye drops alone (control group).

All patients of any age who performed more than one corneal transplant in the same eye for any clinical indication (rejection history with graft failure) or chemical burn with 360° peripheral vascularity from May 2004 to August 2011 were included (consecutive sampling). Patients with previous primary donor failure, incomplete documentation or anterior segment congenital malformation were excluded.

Data were collected on patient characteristics and surgical procedure, such as age (at the period of the last transplantation), gender, follow-up period since the last regrant, size of the recipient cornea trephination, extent of preoperative superficial and deep corneal peripheral vascularization prior to the last PK (ambulatory slit-lamp examination - 360° divided into 4 quadrants), intraocular pressure (IOP) measured by applanation tonometer at 1, 3, 6, 12, 24 and 36 months after the last operation, presence of ABO compatibility, first keratoplasty clinical indication and number of transplants performed in the same eye.

All patients received traditional treatment with 1% prednisolone acetate eye drops for 6 months (prescribed every 3 hours in the first month and then gradually tapered over equally in both groups). From August 2008, all patients undergoing high-risk PK initiated in addition to

1% prednisolone, topical 0.03% tacrolimus twice daily (instilled into the lower conjunctival sac every 12 hours) as adjunctive immunosuppressive therapy on day 15 post-graft. This medication was maintained through the entire study follow-up period and discontinued in case of irreversible rejection confirmation. All rejection episodes were treated in the same way in both groups, using 1% prednisolone eye drops hourly for 7 days and tapering weekly until its suspension. In addition to that, oral 1mg/kg prednisone daily was also prescribed for 7 days tapering 10 mg weekly until its full suspension in both groups. In patients using tacrolimus, this medication was maintained in the same dosage (twice daily) during the entire rejection episode. We quit follow-up at 3 years in the control group to allow a reliable comparison between groups.

Rejection episode signs were characterized by sudden cornea edema with epithelial or endothelial line, subepithelial infiltrates, mild-moderate anterior chamber reaction or keratic precipitates. Persistent cornea edema and cloudiness with loss of transparency after 2 months of rejection treatment was considered secondary failure (irreversible rejection). At this point, the only possible treatment indication was a new corneal transplantation or keratoprosthesis to restore transparency.

The primary outcome was the rate of irreversible rejection (loss of graft transparency). We also analysed the rate of rejection episodes in each group and its IOP. Subgroup analysis was performed based on ABO compatibility.

## **Statistics**

Proportions were used for categorical data. Both mean and standard deviation or median and interquartile range were used for continuous data. The association between categorical variables was evaluated with the *chi-square* test (with *Yates* correction for 2x2 tables). Proportions and odds ratio (OR) were calculated with a 95% confidence interval. To evaluate the comparability of groups at baseline, the association between continuous and categorical variables was analysed by Student's *t*-test. Multiple *t*-tests comparisons were adjusted by Bonferroni correction for statistic significance (modified by Finner). For these analyses we used SPSS version 18.0.<sup>26</sup>

Estimating 45% of irreversible rejection in patients treated with prednisolone alone and 15% in patients treated with tacrolimus and corticosteroid, 35 patients are required in each intervention group to obtain a study power of 80% and an alpha of 0.05.

## **Results**

We identified 81 consecutive patients who underwent more than one PK in the same eye or had severe chemical burn between 2004 and 2011. Of these, 41 patients (41 eyes) performed the last transplant between May 2004 and July 2008, receiving only 1% prednisolone eye drops. Forty patients (40 eyes) between October 2008 and August 2011 received 1% prednisolone and 0.03% tacrolimus eye drops. Three patients instilling only prednisolone and 2 using corticosteroid plus tacrolimus were excluded because they had incomplete data. Each group had one patient with anterior segment malformation and one case of primary donor failure as cause of second graft. These patients were excluded. Ultimately, 36 patients filled criteria in each group. The characteristics among the groups were similar (details summarized in table 1). The mean follow-up of the tacrolimus group was  $23.1 \pm 8.4$  months, while in the control group (only corticosteroid) was  $24.0 \pm 12.4$  months. Clinical indications for first PK demonstrated similar findings between groups (described in table 1). The number of regrafts in each group showed as well an important parity, most of the patients performed two grafts. Two cases submitted to only one PK were due to chemical burn with 360° limbal neovascularization.

Table 1. Patients data

<b>Group</b>	<b>Tacrolimus + Prednisolone</b>	<b>Prednisolone</b>	<b>P</b>
Individuals - n	36	36	
Gender - male (%)	23 (63.9%)	23 (63.9%)	
Age - years $\pm$ SD	52.7 $\pm$ 20.9	48.3 $\pm$ 15.3	0.30
(Range)	(16-85)	(18-77)	
Follow-up -			
Months $\pm$ SD	23.1 $\pm$ 8,4	24.0 $\pm$ 12.4	0.41
<b>Number of grafts before entry this study (%)</b>			0.43
0 graft	2 (5.6%)	0 (0%)	
1 grafts	27 (75.0%)	29 (80.6%)	
2 grafts	4 (11.1%)	5 (8.4%)	
3 grafts	2 (5.6%)	2 (5.6%)	
5grafts	1 (2.7%)	0 (0%)	
<b>Underlying Diagnosis</b>			0.82
Bullous Keratopathy	12 (33.3%)	6 (16.7%)	
Keratoconus	8 (22.2%)	8 (22.2%)	
Herpes simplex virus	4 (11.1%)	7 (19.4%)	
Dystrophies	3 (8.3%)	3 (8.3%)	
Trauma	2 (5.5%)	4 (11.1%)	
Infectious ulcer	2 (5.5%)	4 (11.1%)	
Interstitial keratitis	1 (2.7%)	1 (2.7%)	
Glaucoma	1 (2.7%)	1 (2.7%)	
Chemical burn	3 (8.3%)	2 (5.5%)	

---

SD – Standard deviation.

Categorical variables described as n (%) and compared with chi-square test. Quantitative variables are described as mean ( $\pm$ SD) and compared with Student's t test.

Regarding irreversible rejections, tacrolimus plus prednisolone presented greater protection: only 7 grafts (19.4%) showed loss of clearness due to immunological rejection, compared to 16 (44.4%) that used only prednisolone. We observed smaller rate of rejection episodes with combined therapy (38.8% vs. 61.1%), however without reaching statistical significance (see table 2).

Table 2. Rejection data

Group	Tacrolimus + Prednisolone n=36	Prednisolone n=36	OR	CI 95%	P
Rejection episodes	14 (38.8%)	22 (61.1%)	0.40	0.15 – 1.04	0.09
Irreversible rejection	7 (19.4%)	16 (44.4%)	0.30	0.10 – 0.86	0.04

Variables described as n (%).

CI – confidence interval. OR – Odds Ratio.

Intraoperative characteristics, such as graft trephination size and peripheral vascularization (superficial and deep) were similar in both groups (see table 3).

Table 3. Intraoperative characteristics

	Tacrolimus + Prednisolone	Prednisolone	P
Trephination mean size - mm±SD	7.73±0.34	7.88±0.37	0.09
Peripheral vascularization - in quadrants (Interquartile range)	2.1 (1.0 – 3.75)	1.9 (1.0 – 3.0)	0.87

SD – Standard deviation

Quantitative variables with asymmetric distribution are described as median (interquartile range) and compared with Mann-Whitney test. Quantitative variables with symmetric distribution are

---

described as mean ( $\pm$ SD) and compared with Student's t test.

There was no significant difference in IOP among groups in the analysed periods (see table 4).

Table 4. Mean IOP (mmHg,  $\pm$ SD)

Month	Tacrolimus + Prednisolone	Prednisolone	P
1	14.7 $\pm$ 4.6	16.1 $\pm$ 5.6	0.28
3	13.8 $\pm$ 3.9	16.3 $\pm$ 4.7	0.11
6	13.1 $\pm$ 3.7	15.0 $\pm$ 4.4	0.17
12	13.5 $\pm$ 4.1	14.6 $\pm$ 4.1	0.30
24	12.9 $\pm$ 3.3	15.0 $\pm$ 3.8	0.17
36	12.8 $\pm$ 3.2	13.9 $\pm$ 3.7	0.22

---

SD – Standard deviation. mmHg – millimetres of Mercury. IOP – Intraocular pressure.

Quantitative variables with symmetric distribution are described as mean ( $\pm$ SD) and compared with Student's t test. Bonferroni correction (modified by Finner) was used to adjust *P* values.

ABO compatibility was identified in 14 patients of the tacrolimus plus prednisolone group and in 7 of the control group. This difference was not statistically significant (table 5).

Table 5. ABO compatibility

ABO compatibility	Yes	No	P
Tacrolimus + Prednisolone–n (%)	14 (38.9%)	22 (61.1%)	
Prednisolone– n (%)	7 (19.4%)	29 (80.6%)	0.12

---

Categorical variables were described as frequencies and compared with *chi-square*

---

test

ABO – A, B, O or AB blood groups compatibility.

## **Discussion**

In our study with high-risk corneal grafts, the use of topical 0.03% tacrolimus significantly decreased the incidence of irreversible rejection (19.4% versus 44.4% control group). There were less rejection episodes in the tacrolimus group (38.8% versus 61.1% control group) with an important absolute risk reduction (22.2%), although the difference was not statistically significant. The most important result was the preservation of transparency in 80.6% of the patients who used tacrolimus eye drops, which represented a 50% recovery of the grafts that have been submitted to an initial rejection episode. This result was statistically significant with an absolute risk reduction of 25%. About one in every 4 patients will benefit from the tacrolimus rejection prophylaxis (number needed to treat in order to prevent one irreversible rejection). Increasing the number of patients may also demonstrate the effectiveness of tacrolimus topical immunosuppression in rejection episodes.

Since systemic immunosuppressive therapy presents serious side effects, topical administration should be preferred. Thus, clinical trials with cyclosporine A eye drops at a concentration of 0.5% and 2% were carried out to define its immunosuppressive effect. The results were not favourable in the high-risk group.<sup>27</sup> Traditional treatment with topical 1% prednisolone monotherapy also showed unsatisfactory results: in a research with 116 patients who underwent regrafts, the survival rate was only 63.9% in 2 years.<sup>15</sup> This rate is similar to the 36 patients who used only corticosteroid in our study (58.3%).

We established two groups with similar high-risk characteristics and analysed the trephination size of the recipient cornea and the limbal vascular bed. Peripheral vascularization seems to be the main factor associated with rejection, according to several studies.<sup>4-5</sup> We found no statistical difference in any of these variables between groups.

As already demonstrated in other studies, there was no increase in intraocular pressure related to the use of tacrolimus.<sup>28</sup> Both groups had equal mean IOP.

Our main limitation is due to the fact that this is a retrospective study. However, there were very few documentation losses. The role of ABO compatibility is difficult to measure in this

study. Even though no statistical difference was found regarding ABO, this feature constitutes a selection bias that we tried to minimize enlisting patients with the same characteristics in both groups. It is necessary to deepen research in well-selected high-risk recipients to define its real contribution in rejection prevention.

There are still questions in other studies about the tolerance of topical tacrolimus.<sup>21</sup> In 0.05% concentration, its distribution and *in vivo* stability presented good results and no alteration in aqueous humour or accumulation.<sup>22</sup> In our cohort, only 4 patients (11,1%) reported mild discomfort after topical instillation of tacrolimus (warm sensation). However, none of these discontinued this medication due to intolerance or ocular surface disease (no evidence of epithelial erosion or keratitis). In Brazil, tacrolimus is manipulated with olive oil as a vehicle and presents good tolerance.<sup>29-30</sup> Our rationale for commencing tacrolimus at post-graft day 15 was epithelium recovery.

This original study suggests that tacrolimus associated with topical prednisolone increases corneal allograft survival in high-risk recipients during moderate follow-up with low side effects. Our results point to the protection of graft clearness greater than or equal compared to systemic immunosuppression reported in other studies.<sup>15-19, 31</sup> Randomized clinical trials are necessary to establish greater effectiveness of this medication.

## References

1. George AJ, Larkin DF. Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am J Transplant* 2004;4:678–85.
2. RBT – Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XVIII No. 4. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2012/rbt2012-parciall.pdf>

3. The Collaborative Corneal Transplantation Studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1392-403.
4. Niederkorn JY. High-risk corneal allografts and why they lose their immune privilege. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10(5):493-7.
5. Larkin DF. Corneal transplantation for herpes simplex keratitis. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(2):107-8.
6. Feng CM, Chen JQ, Li YP. Factors of graft failure after chemical corneal injury. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 1994;30(7):277-9.
7. Epstein AJ, de Castro TN, Laibson PR, et al. Risk factors for the first episode of corneal graft rejection in keratoconus. *Cornea* 2006;25:1005–11.
8. Boisjoly HM, Bernard PM, Dube I, et al. Effect of factors unrelated to tissue matching on corneal transplant endothelial rejection. *Am J Ophthalmol*. 1989;15(6)107:647-54.
9. Patel NP, Kim T, Rapuano CJ, et al. Indications for and outcomes of repeat penetrating keratoplasty 1989-1995. *Ophthalmology* 2000;107:719-24.
10. Coster DJ, Williams KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2005;140(6):1112-22.

11. Randleman JB, Stulting RD. Prevention and treatment of corneal graft rejection: current practice patterns. *Cornea* 2006;25(3):286-90.
12. Ebihara N, Ohtomo K, Tokura T, et al. Effect of Tacrolimus on Chemokine Production by Corneal Myofibroblasts via Toll-Like Receptors, Compared With Cyclosporine and Dexamethasone. *Cornea* 2011;30(6):702-8.
13. Price MO, Price F. Efficacy of topical Cyclosporine 0,05% for prevention of cornea transplant rejection episodes *Ophthalmology* 2006;113(10):1786-90.
14. Scheer S; Touzeau O; Borderie V; Laroche L. Immunosuppression in corneal transplantation. *J Fr Ophtalmol* 2003;26(6):637-47.
15. Young AL; Rao SK; Cheng LL; et al. Combined intravenous pulse methylprednisolone and oral cyclosporine A in the treatment of corneal graft rejection: 5-year experience. *Eye*. 2002;16(3):304-8.
16. Reis A; Reinhard T; Voiculescu A; et al. Mycophenolate mofetil versus cyclosporin A in high risk keratoplasty patients: a prospectively randomised clinical trial. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(11):1268-71.
17. Joseph A, Raj D, Shanmuganathan V, et al. Tacrolimus immunosuppression in high-risk corneal grafts. *Br J Ophthalmol* 2007;91(1):51-5.
18. Rumelt S, Bersudsky V, Blum-Hareuveni T, et al. Systemic cyclosporin A in high failure risk, repeated corneal transplantation. *Br J Ophthalmol* 2002;86:988–92.
19. Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty. Short- versus long-term therapy.

Ophthalmology 1994;101:128–33.

20. Weisbrod DJ, Sit M, Naor J, Slomovic AR. Outcomes of repeat penetrating keratoplasty and risk factors for graft failure. *Cornea* 2003;22(5):429-34.

21. Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus (FK506) in the management of high-risk corneal and limbal grafts. *Ophthalmology* 2001;108:1838–44.

22. Yuan J, Zhai J, Chen J, et al. Preparation of 0,05% FK506 Suspension Eyedrops and Its Pharmacokinetics After Topical Ocular Administration. *Jour of Ocul Pharmacol and Therap* 2009;25(4):345-50.

23. Mills RA, Jones DB, Winkler CR, et al. Topical FK-506 prevents experimental corneal allograft rejection. *Cornea* 1995;14(2):157-60.

24. Dhaliwal JS, Mason BF, Kaufman SC. Long-term Use of Topical Tacrolimus (FK506) in High-risk Penetrating Keratoplasty. *Cornea* 2008;27(4):488-93.

25. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE). <http://www.strobe-statement.org>. Accessed January 15, 2013.

26. Statistical Package for the Social Sciences [computer program]. Version 18.0. IBM.

27. Sinha R, Jhanji V, Verma K, et al. Efficacy of topical cyclosporine A 2% in prevention of graft rejection in high-risk keratoplasty: a randomized controlled trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:1167-72.

28. Reinhard T, Mayweg S, Reis A, et al. Topical FK506 as immunoprophylaxis after allogeneic penetrating normal-risk keratoplasty: a randomized clinical pilot study. *Transpl Int* 2005;18:193-7.

29. Moscovici BK, Holzchuh R, Chiacchio BB, et al. Clinical treatment of dry eye using 0.03% tacrolimus eye drops. *Cornea*. 2012;31(8):945-9.

30. Ohashi Y, Ebihara N, Fujishima H, et al. A randomized, placebo-controlled clinical trial of tacrolimus ophthalmic suspension 0.1% in severe allergic conjunctivitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2010;26:165–174.

31. Chatel MA, Larkin DF. Sirolimus and Mycophenolate as combination prophylaxis in corneal transplant recipients at high rejection risk. *Am J Ophthalmol*. 2010;150(2):1797-884.

**Anexo**

## **Artigo Científico Original – Língua Portuguesa**

### **Prevenção de rejeição em transplantes de córnea de alto risco com tacrolimus 0,03% colírio: um estudo de coorte**

**Magalhães, OA; Marinho, DR; Kwitko, S.**

#### **Resumo**

##### Introdução

O presente estudo tem como objetivo identificar a incidência de rejeição e a segurança do colírio de tacrolimus 0,03% associado a prednisolona 1% em uma formulação tópica, comparando-os à monoterapia de prednisolona 1% colírio em pacientes com transplante de córnea de alto risco.

##### Métodos

Estudo de coorte retrospectivo com 72 pacientes (72 olhos) submetidos a mais de uma ceratoplastia penetrante (CP) no mesmo olho ou expostos à queimadura química grave entre os anos de 2004 e 2011 no Departamento de Córnea e Doenças Externas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Foram comparados os prontuários de 36 pacientes que realizaram CP unilateral e receberam prednisolona 1% colírio entre maio de 2004 e julho de

2008, a 36 pacientes submetidos igualmente à CP e à profilaxia com prednisolona 1% tópica e tacrolimus 0,03% colírio entre agosto de 2008 e agosto de 2011.

## Resultados

O tempo médio de acompanhamento do grupo exposto ao tacrolimus foi de 23,1 meses e 24,0 no grupo controle com prednisolona. Os dados demográficos e intra-operatórios foram semelhantes entre os grupos, assim como a quantidade de retransplantes realizados e suas indicações iniciais. A pressão intra-ocular (PIO) não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Quanto a rejeições irreversíveis, o colírio de tacrolimus apresentou maior proteção: apenas 7 enxertos (19,4%) perderam a transparência contra 16 (44,4%) no grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## Conclusão

O colírio de tacrolimus associado à prednisolona tópica foi eficaz em reduzir rejeição irreversível em pacientes com transplante de córnea de alto risco sem aumentar a PIO.

## Introdução

O transplante de córnea é realizado há mais de 100 anos e apresenta resultados muito positivos, seja na sua taxa de sobrevida ou no seu desfecho visual.<sup>1</sup> Em 2011, 14.696 transplantes de córnea foram realizados no Brasil segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. A maioria das ceratoplastias acontecem como primeiro transplante em receptores de baixo risco, incluindo pacientes com ceratocone e ceratopatia bolhosa. Estas condições apresentam uma sobrevivência acima de 90% em dois anos.<sup>2</sup> Desafio maior ocorre em casos de queimadura química, doenças auto-imunes, história anterior de rejeição, córneas vascularizadas, ceratite pelo vírus *Herpes simplex* (HSV) e diâmetro de trepanação da córnea receptora superior a 8,25 mm.<sup>3-7</sup> Apesar dos avanços na terapia anti-inflamatória e anti-glaucomatosa, em técnicas cirúrgicas e cuidados pós-operatórios, a incidência de rejeição permanece elevada neste grupo de pacientes.<sup>8</sup>

O tacrolimus (também chamado FK506), assim como a ciclosporina A (CsA) são drogas bloqueadoras da calcineurina, que inibem a expansão clonal dos linfócitos T por meio de ligação das proteínas intracelulares chamada imunofilinas.<sup>9</sup> Os agentes tradicionalmente prescritos para prevenir e tratar a rejeição em todos os pacientes submetidos à ceratoplastia são os corticosteróides tópicos, embora seu uso apresente vários efeitos adversos.<sup>10</sup> Não há consenso em relação à prevenção de rejeição em receptores de alto risco. Entre as alternativas farmacológicas, utiliza-se imunossuppressores sistêmicos associados aos corticosteróides tópicos, ou mais recentemente, à CsA tópica de 0,5% e 2%.<sup>11</sup> Apesar de seu benefício aparente, não há evidência científica de que qualquer medicação seja superior ao tratamento tradicional com prednisolona tópica 1%.<sup>11-12</sup> A abordagem sistêmica também é alvo de pesquisas, porém seu benefício é questionável, uma vez que apresenta alta incidência de efeitos adversos.<sup>13-21</sup>

Há quase vinte anos, um estudo experimental demonstrou eficácia significativa do tacrolimus 0,3 mg/ml tópico na prevenção da rejeição endotelial em transplante de córnea de coelhos.<sup>22</sup> Em relato de caso recente, o colírio de tacrolimus 0,03% demonstrou boa segurança e tolerância, impedindo novos episódios de rejeição em 4 transplantes de alto risco quando associados à administração tópica de corticoesteróides.<sup>23</sup> Os estudos disponíveis têm baixo nível de evidência e nenhum grupo controle em seres humanos.

Nosso trabalho tem como objetivo avaliar a incidência de rejeição e segurança do colírio de tacrolimus associado à prednisolona tópica, comparando-os com prednisolona tópica em monoterapia nos pacientes com alto risco de rejeição.

## **Métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil (número do protocolo 11-0432) e conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki. Todos os dados inseridos aqui seguiram a recomendação em estudos observacionais (STROBE).<sup>24</sup>

Realizamos um estudo de coorte retrospectivo que avaliou os prontuários de pacientes considerados de alto risco para rejeição que se submeteram à ceratoplastia penetrante (CP) no Departamento de Córnea e Doenças Externas dessa instituição. Todos

os procedimentos foram realizados no mesmo centro, com a mesma técnica cirúrgica (suturas interrompidas) e por diferentes cirurgiões. As córneas foram armazenadas em solução Optisol-GS®. Nosso objetivo foi avaliar a evolução clínica dos pacientes tratados com colírio de tacrolimus 0,03% diluído em azeite de oliva estéril (Ophthalmos Pharma, São Paulo, Brasil) concomitantemente ao uso da prednisolona 1% tópica, comparando-os à prednisolona 1% tópica em monoterapia (grupo controle).

Foram incluídos todos os pacientes de qualquer idade que realizaram mais de um transplante de córnea no mesmo olho (história prévia de falência por rejeição imunológica) ou foram submetidos à CP por queimadura química com 360° de vascularização periférica entre maio de 2004 e agosto de 2011. Pacientes com falência primária anterior, documentação incompleta ou malformação congênita do segmento anterior foram excluídos. Coletamos as informações sobre as características do paciente e do procedimento cirúrgico: primeira indicação clínica de CP, número de transplantes realizados no mesmo olho, idade (durante o último transplante), sexo, *follow-up* (desde a última CP), tamanho da trepanação da córnea receptora, extensão da vascularização periférica superficial e profunda antes da última CP (em ambulatório sob biomicroscopia - 360° divididos em quatro quadrantes), pressão intra-ocular (PIO - medida por um tonômetro de aplanção no mês 1, 3, 6, 12, 24 e 36 após a última CP) e presença ou não de compatibilidade ABO.

Como o grupo que utilizou prednisolona em monoterapia havia realizado seus transplantes há mais tempo (2004 a 2008), para permitir uma comparação fidedigna, foi estabelecido como seguimento máximo o período de 3 anos para ambos os grupos.

Todos os pacientes receberam tratamento tradicional com de acetato de prednisolona 1% colírio por 6 meses (prescrito a cada 3 horas no primeiro mês e, depois gradualmente reduzido). A partir de agosto de 2008, todos os pacientes submetidos à CP de alto risco receberam além da prednisolona 1%, tacrolimus tópico 0,03% duas vezes ao dia (instilado a cada 12 horas) como terapia imunossupressora adjuvante a partir do 15° dia pós-transplante. Este medicamento foi mantido durante todo o seguimento do estudo e interrompido em caso de confirmação de rejeição irreversível. Todos os episódios de rejeição foram tratados da mesma forma em ambos os grupos: utilizando-se prednisolona 1% tópica de hora em hora por 7 dias, sendo reduzida semanalmente até a sua suspensão. Além disso,

prednisona oral 1mg/kg diária também foi prescrita durante 7 dias, sendo reduzida 10 mg por semana até a sua suspensão total em ambos os grupos. Em pacientes que utilizavam tacrolimus, este medicamento foi mantido na mesma dosagem (duas vezes por dia) durante todo o episódio de rejeição.

Os sinais de um episódio de rejeição foram caracterizados pela presença de edema de córnea súbito com linha epitelial ou endotelial, infiltrados subepiteliais, reação de câmara anterior leve à moderada ou precipitados ceráticos. Se o edema de córnea persistisse e houvesse perda da transparência após 2 meses de tratamento, a rejeição era considerada irreversível (falência secundária). Neste ponto, a única indicação possível para restaurar a função visual seria um novo transplante córnea ou o implante de uma ceratoprótese.

O desfecho primário avaliado foi a incidência de rejeição irreversível (perda da transparência do transplante). Comparamos também a incidência de episódios de rejeição em cada grupo e sua PIO. Análise de subgrupo foi realizada com base na compatibilidade ABO.

### **Estatística**

Os dados categóricos foram analisados por proporções. Os dados contínuos, por sua vez, usaram média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. A associação entre as variáveis categóricas foi avaliada com o teste de *qui-quadrado* (com correção de *Yates* para tabelas 2x2). Proporções e *odds ratio* (OR) foram calculados com intervalo de confiança de 95%. Para avaliar a comparabilidade dos grupos no início do estudo, a associação entre variáveis contínuas e categóricas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. Múltiplos testes *t* foram ajustados pela correção de Bonferroni para significância estatística (modificada por *Finner*). Para estas análises foi utilizado o programa SPSS versão 18.0.<sup>25</sup>

Estimando 45% de rejeição irreversível em pacientes tratados apenas com prednisolona e 15% em pacientes tratados com tacrolimus mais corticosteróides, 35 transplantes eram necessários em cada grupo para obter um poder de estudo de 80% e um alfa de 0,05.

### **Resultados**

Foram identificados 81 pacientes consecutivos submetidos à CP por retransplante no mesmo olho ou por exposição à queimadura química entre 2004 e 2011. Destes, 41 pacientes (41 olhos) realizaram o último transplante entre maio de 2004 e julho de 2008, recebendo apenas colírio de prednisolona 1%. Quarenta pacientes (40 olhos), entre outubro de 2008 e agosto de 2011 receberam prednisolona 1% mais tacrolimus colírio 0,03%. Três pacientes do grupo controle e 2 do grupo tacrolimus foram excluídos porque não apresentam registros completos. Cada grupo continha um paciente com Anomalia de Peters (malformação do segmento anterior) e um caso de falência primária como causa de segundo transplante. Estes pacientes foram excluídos. Em última análise, 36 pacientes preencheram os critérios em cada grupo.

As características entre os grupos foram semelhantes (Tabela 1). O tempo médio de acompanhamento do grupo tacrolimus foi de 23,1  $\pm$ 8,4 meses, enquanto que no grupo controle foi de 24,0  $\pm$ 12,4 meses. As indicações clínicas para a primeira CP demonstraram resultados semelhantes entre os grupos (Tabela 1). O número de retransplantes em cada grupo mostrou também uma paridade importante.

Tabela 1. Dados dos pacientes

<b>Grupos</b>	<b>Tacrolimus + Prednisolona</b>	<b>Prednisolona</b>	<b>P</b>
Indivíduos - n	36	36	
Sexo - masculino (%)	23 (63,9%)	23 (63,9%)	
Idade - anos $\pm$ DP (amplitude)	52,7 $\pm$ 20,9 (16-85)	48,3 $\pm$ 15,3 (18-77)	0,30
Seguimento - Meses $\pm$ DP	23,1 $\pm$ 8,4	24,0 $\pm$ 12,4	0,41
<b>Número de CP antes de entrar no estudo (%)</b>			0,43
1 transplante	2 (5,6%)	0 (0%)	
2 transplantes	27 (75,0%)	29 (80,6%)	
3 transplantes	4 (11,1%)	5 (8,4%)	

4 transplantes	2 (5,6%)	2 (5,6%)	
6 transplantes	1 (2,7%)	0 (0%)	
<b>Diagnóstico de base</b>			<b>0,82</b>
Ceratopatia bolhosa	12 (33,3%)	6 (16,7%)	
Ceratocone	8 (22,2%)	8 (22,2%)	
Herpes simples	4 (11,1%)	7 (19,4%)	
Distrofias	3 (8,3%)	3 (8,3%)	
Trauma	2 (5,5%)	4 (11,1%)	
Úlcera infecciosa	2 (5,5%)	4 (11,1%)	
Ceratite intersticial	1 (2,7%)	1 (2,7%)	
Glaucoma	1 (2,7%)	1 (2,7%)	
Queimadura química	3 (8,3%)	2 (5,5%)	

DP – Desvio padrão. CP – Ceratoplastias penetrantes  
 Variáveis categóricas descritas em n(%) e comparadas pelo teste de qui-quadrado.  
 Variáveis quantitativas descritas em média ( $\pm$ DP) e comparadas pelo teste *t* de Student.

Quanto às rejeições irreversíveis, o tacrolimus mais prednisolona apresentaram maior proteção: apenas 7 transplantes (19,4%) mostraram perda de transparência devido à rejeição imunológica, em comparação a 16 (44,4%) que utilizaram apenas prednisolona. Observou-se menor incidência de episódios de rejeição com a terapia combinada (38,8% *versus* 61,1%), porém sem atingir significância estatística (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de rejeição imunológica

<b>Grupos</b>	<b>Tacrolimus + Prednisolona</b>	<b>Prednisolona</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>n=36</b>	<b>n=36</b>			
Episódios de rejeição	14 (38,8%)	22 (61,1%)	0,40	0,15 – 1,04	0,09
Rejeições irreversíveis	7 (19,4%)	16 (44,4%)	0,30	0,10 – 0,86	0,04

Variáveis categóricas descritas em n(%)

IC – intervalo de confiança. OR – *Odds Ratio*.

As características intra-operatórias, tais como o tamanho da trepanação da córnea receptora e a vascularização periférica (superficial e profunda) foram semelhantes em ambos os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Características intra-operatórias

	<b>Tacrolimus + Prednisolona</b>	<b>Prednisolona</b>	<b>P</b>
Tamanho da trepanação - mm $\pm$ DP	7,73 $\pm$ 0,34	7,88 $\pm$ 0,37	0,09
Vascularização - em quadrantes (intervalo Interquartil)	2,1 (1,0 – 3,75)	1,9 (1,0 – 3,0)	0,87

DP – Desvio Padrão. mm – milímetros

Variáveis quantitativas com distribuição assimétrica foram descritas em mediana (intervalo interquartil) e comparadas pelo teste de *Mann-Whitney*. Variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas em média ( $\pm$ DP) e comparadas pelo teste *t* de Student.

Não houve diferença estatisticamente significativa na média da PIO entre os grupos nos períodos analisados (Tabela 4).

Tabela 4. Média da PIO (mmHg,  $\pm$ DP)

<b>Mês</b>	<b>Tacrolimus + Prednisolona</b>	<b>Prednisolona</b>	<b>P</b>
1	14.7 $\pm$ 4.6	16.1 $\pm$ 5.6	0.28
3	13.8 $\pm$ 3.9	16.3 $\pm$ 4.7	0.11
6	13.1 $\pm$ 3.7	15.0 $\pm$ 4.4	0.17
12	13.5 $\pm$ 4.1	14.6 $\pm$ 4.1	0.30
24	12.9 $\pm$ 3.3	15.0 $\pm$ 3.8	0.17
36	12.8 $\pm$ 3.2	13.9 $\pm$ 3.7	0.22

DP – Desvio padrão. mmHg – milímetros de Mercúrio. PIO – pressão intraocular

Variáveis quantitativas com distribuição simétrica descritas em média ( $\pm$ DP) e comparadas pelo teste *t* de Student.

Correção de *Bonferroni* (modificado por *Finner*) usado para ajuste do valor P.

A compatibilidade de grupos sanguíneos ABO foi identificada em 14 pacientes do grupo tacrolimus mais prednisolona e em 7 pacientes do grupo controle. Esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Compatibilidade ABO

Compatibilidade ABO	Sim	Não	P
Tacrolimus + Prednisolona – n (%)	14 (38,9%)	22 (61,1%)	
Prednisolona – n (%)	7 (19,4%)	29 (80,6%)	0,12

Variáveis categóricas descritas em n(%) e comparadas pelo teste de *qui-quadrado*. ABO – A, B, O ou AB grupos de compatibilidade sanguínea.

## Discussão

Em nosso estudo com transplantes de alto risco, o uso do colírio de tacrolimus, juntamente com a prednisolona tópica, reduziu significativamente a incidência de rejeição irreversível (19,4% versus 44,4% do grupo de controle). Houve menos episódios de rejeição no grupo tacrolimus (38,8% versus 61,1% do grupo controle), com uma importante redução do risco absoluto (22,2%), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. O resultado mais expressivo foi a preservação da transparência em 80,6% dos pacientes que utilizaram a suplementação de tacrolimus, o que representou uma recuperação de 50% dos enxertos que foram submetidos a um episódio inicial de rejeição (redução do risco absoluto de 25%). O número de pacientes necessários para impedir um episódio de rejeição irreversível é de 4,0 com o uso de tacrolimus. Isto é, um em cada quatro pacientes se beneficiará da profilaxia de rejeição irreversível com o uso de tacrolimus. Aumentando o número de pacientes, pode-se demonstrar a eficácia da imunossupressão tópica de tacrolimus também em episódios de rejeição.

Uma vez que a terapia imunossupressora sistêmica apresenta efeitos adversos graves, a administração tópica deve ser preferida. Por isso, ensaios clínicos com a CsA colírio em concentrações de 0,5% e 2% foram realizados para definir o seu efeito imunossupressor. Contudo, os resultados não foram positivos. O tratamento com monoterapia tópica de prednisolona 1% em pacientes de alto risco também apresentou resultados insatisfatórios: em uma pesquisa com 116 pacientes submetidos à retransplante, a taxa de sobrevivência foi de apenas 63,9% em dois anos.<sup>14</sup> Essa incidência é semelhante a dos 36 pacientes que utilizaram apenas corticosteróide em nosso estudo (58,3%).

Foram estabelecidos dois grupos com características semelhantes de alto risco para rejeição. Analisamos o tamanho da trepanação da córnea receptora e do leito vascular do limbo. Esta última característica parece ser o principal fator associado à rejeição, estando de acordo com vários estudos.<sup>3,4</sup> Não encontramos diferença estatística em nenhuma dessas variáveis entre os nossos grupos.

Tal como já foi demonstrado em outros estudos, não houve aumento da PIO relacionada à utilização de tacrolimus.<sup>27</sup> Ambos os grupos apresentaram PIO média semelhante.

Nossa principal limitação é o caráter retrospectivo do estudo, apesar de ter havido poucas perdas de dados. O papel da compatibilidade ABO é difícil mensurar neste estudo. Mesmo não havendo diferença estatística em relação a este fator, sabemos que tal característica constitui um viés de seleção, que tentamos minimizar recrutando pacientes com as mesmas características em ambos os grupos. É necessário aprofundar a investigação em receptores de alto risco bem selecionados para definir a sua real contribuição na prevenção da rejeição.

Há questionamentos em outros estudos sobre a tolerância ao tacrolimus.<sup>20</sup> Na concentração de 0,05%, sua distribuição e estabilidade *in vivo* apresentaram bons resultados e nenhuma alteração ou acúmulo no humor aquoso.<sup>21</sup> Em nossa coorte, alguns pacientes queixaram-se de um leve desconforto após instilação do tacrolimus (sensação de queimação). No entanto, nenhum destes descontinou o medicamento devido à intolerância. No Brasil, o tacrolimus é manipulado com óleo de oliva como veículo e apresenta relatos de

boa tolerância.<sup>28-29</sup> Nossa justificativa para iniciar o tacrolimus no 15º dia de pós-operatório foi a recuperação completa do epitélio corneano.

Este estudo mostrou que o colírio de tacrolimus associado à prednisolona tópica aumentou a sobrevida da córnea doada em pacientes de alto risco durante seguimento de aproximadamente dois anos com efeitos adversos reduzidos. Nossos resultados apontam para a proteção da transparência do enxerto maior ou igual em comparação à imunossupressão sistêmica relatada em outros estudos.<sup>14-18,30</sup> Ensaios clínicos randomizados são necessários para confirmar a eficácia deste medicamento.

## **Referências**

1. George AJ, Larkin DF. Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am J Transplant* 2004;4:678–85.
2. The Collaborative Corneal Transplantation Studies (CCTS). Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. *Arch Ophthalmol*1992;110:1392-403.
3. Niederkorn JY. High-risk corneal allografts and why they lose their immune privilege. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*2010;10(5):493-7.
4. Larkin DF. Corneal transplantation for herpes simplex keratitis. *Br J Ophthalmol*.1998;82(2):107-8.
5. Feng CM, Chen JQ, Li YP. Factors of graft failure after chemical corneal injury. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*1994;30(7):277-9.

6. Epstein AJ, de Castro TN, Laibson PR, et al. Risk factors for the first episode of corneal graft rejection in keratoconus. *Cornea* 2006;25:1005–11.
7. Boisjoly HM, Bernard PM, Dube I, et al. Effect of factors unrelated to tissue matching on corneal transplant endothelial rejection. *Am J Ophthalmol.* 1989;15(6):647-54.
8. Patel NP, Kim T, Rapuano CJ, et al. Indications for and outcomes of repeat penetrating keratoplasty 1989-1995. *Ophthalmology* 2000;107:719-24.
9. Coster DJ, Williams KA. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2005;140(6):1112-22.
10. Randleman JB, Stulting RD. Prevention and treatment of corneal graft rejection: current practice patterns. *Cornea* 2006;25(3):286-90.
11. Ebihara N, Ohtomo K, Tokura T, et al. Effect of Tacrolimus on Chemokine Production by Corneal Myofibroblasts via Toll-Like Receptors, Compared With Cyclosporine and Dexamethasone. *Cornea* 2011;30(6):702-8.
12. Price MO, Price F. Efficacy of topical Cyclosporine 0,05% for prevention of cornea transplant rejection episodes *Ophthalmology* 2006;113(10):1786-90.
13. Scheer S; Touzeau O; Borderie V; Laroche L. Immunosuppression in corneal transplantation. *J Fr Ophtalmol* 2003;26(6):637-47.

14. Young AL; Rao SK; Cheng LL; et al. Combined intravenous pulse methylprednisolone and oral cyclosporine A in the treatment of corneal graft rejection: 5-year experience. *Eye*. 2002;16(3):304-8.
15. Reis A; Reinhard T; Voiculescu A; et al. Mycophenolate mofetil versus cyclosporin A in high risk keratoplasty patients: a prospectively randomised clinical trial. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(11):1268-71.
16. Joseph A, Raj D, Shanmuganathan V, et al. Tacrolimus immunosuppression in high-risk corneal grafts. *Br J Ophthalmol* 2007;91(1):51-5.
17. Rumelt S, Bersudsky V, Blum-Hareuveni T, et al. Systemic cyclosporin A in high failure risk, repeated corneal transplantation. *Br J Ophthalmol* 2002;86:988–92.
18. Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty. Short- versus long-term therapy. *Ophthalmology* 1994;101:128–33.
19. Weisbrod DJ, Sit M, Naor J, Slomovic AR. Outcomes of repeat penetrating keratoplasty and risk factors for graft failure. *Cornea* 2003;22(5):429-34.
20. Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus (FK506) in the management of high-risk corneal and limbal grafts. *Ophthalmology* 2001;108:1838–44.
21. Yuan J, Zhai J, Chen J, et al. Preparation of 0,05% FK506 Suspension Eyedrops and Its Pharmacokinetics After Topical Ocular Administration. *Jour of Ocul Pharmacol and Therap* 2009;25(4):345-50.

22. Mills RA, Jones DB, Winkler CR, et al. Topical FK-506 prevents experimental corneal allograft rejection. *Cornea* 1995;14(2):157-60.
23. Dhaliwal JS, Mason BF, Kaufman SC. Long-term Use of Topical Tacrolimus (FK506) in High-risk Penetrating Keratoplasty. *Cornea* 2008;27(4):488-93.
24. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE). <http://www.strobe-statement.org>. Accessed January 15, 2013.
25. Statistical Package for the Social Sciences [computer program]. Version 18.0. IBM.
26. Sinha R, Jhanji V, Verma K, et al. Efficacy of topical cyclosporine A 2% in prevention of graft rejection in high-risk keratoplasty: a randomized controlled trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:1167-72.
27. Reinhard T, Mayweg S, Reis A, et al. Topical FK506 as immunoprophylaxis after allogeneic penetrating normal-risk keratoplasty: a randomized clinical pilot study. *Transpl Int* 2005;18:193-7.
28. Moscovici BK, Holzchuh R, Chiacchio BB, et al. Clinical treatment of dry eye using 0.03% tacrolimus eye drops. *Cornea*. 2012;31(8):945-9.
29. Ohashi Y, Ebihara N, Fujishima H, et al. A randomized, placebo-controlled clinical trial of tacrolimus ophthalmic suspension 0.1% in severe allergic conjunctivitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2010;26:165–174.
30. Chatel MA, Larkin DF. Sirolimus and Mycophenolate as combination prophylaxis in corneal transplant recipients at high rejection risk. *Am J Ophthalmol*. 2010;150(2):1797-884.

