

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LEANDRO LIMA

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA CONJUNTIVA DE COELHOS
SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM FÁRMACOS ANTIGLAUCOMATOSOS
TÓPICOS COM E SEM CONSERVANTES.**

CURITIBA – 2014
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA CONJUNTIVA DE COELHOS
SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM FÁRMACOS ANTIGLAUCOMATOSOS
TÓPICOS COM E SEM CONSERVANTES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: Professor Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada **“ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA CONJUNTIVA DE COELHOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM FARMACOS ANTIGLAUCOMATOSOS TÓPICOS COM E SEM CONSERVANTES”** apresentada pelo Doutorando **LEANDRO LIMA** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 3 de dezembro de 2014

Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador

Professora Dra. Heloisa Helena Abill Russ
Membro

Professora Dra. Núbia Vanessa dos A. L. Henrique de Faria
Membro

Professor Dr. Regério Ribas Lange
Membro

Professor Dr. Iván Roque de Barros Filho
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Heloisa Helena Abil Russ, uma das maiores autoridades na pesquisa sobre superfície ocular e glaucoma. Idealizadora e coorientadora; exerceu uma importante participação nesta pesquisa, firmando a parceria com a Empresa patrocinadora MSD - Merck Sharp & Dohme da França, a qual forneceu todo subsídio e suporte financeiro ao estudo.

Agradeço à Dra. Núbia Vanessa dos Anjos Lima Henrique de Faria, por aceitar participar desta banca, e por se dispor a auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR:

Dr. Ivan Roque de Barros Filho, pela amizade, incentivo à docência e por permitir a criação de um Biotério de Oftalmologia Comparada dentro das Instalações do HVUFPR e

Dr. Rogério Ribas Lange pela amizade, apoio à pesquisa, pela sabedoria transmitida, auxílio na execução de atividades práticas, por me incentivar durante o período de aprendizado como professor substituto da UFPR.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário da UFPR, especialmente ao Carlos Fernandes da Silva, pelo incansável trabalho de transporte dos animais ao Biotério.

Aos colegas de Pós-graduação que conviveram durante o período e que fizeram parte da equipe de Oftalmologia Comparada. Especialmente à Amália Turner Giannico, que participou com os animais da mesma pesquisa e vivenciou todos os momentos deste estudo de maneira surpreendentemente agradável!

A Gillian Shaw, pela revisão científica e do inglês nos artigos.

À médica veterinária Andreíse Costa Przydzimirski, e às alunas de graduação Clara Alita Ponkzec e Fátima Aparecida de Lara, pelos cuidados aos animais do estudo e pela dedicação, seriedade e compromisso. Sem elas tudo seria muito mais difícil!

À equipe do Laboratório de Patologia da PUC-PR: Ana, Marina, Seigo e professora Lúcia de Noronha, por todo auxílio técnico e preparação de material histológico, suporte na aquisição de material, e pela amizade adquirida.

Ao sistema de Ensino que me propiciou uma bolsa de estudos durante este período.

Agradeço especialmente o grande orientador e amigo Fabiano Montiani-Ferreira, que a cada dia de convívio me ensina mais sobre ciência, que me guiou pelos caminhos da Oftalmologia Comparada e que abriu muitas portas e oportunidades para a continuidade da minha carreira profissional!

RESUMO

A presente tese de doutorado está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo, que será enviado ao periódico Arquivos Brasileiros de Oftalmologia Veterinária, é uma introdução onde são fornecidas informações básicas na forma de uma breve revisão para propiciar ao leitor noções relacionadas à oftalmologia de coelhos, descrição breve e objetiva de alguns passos importantes para quem deseja reproduzir um estudo que envolva a avaliação da conjuntiva ou da superfície ocular. Aborda ainda informações relacionadas à anatomia, histologia básica da conjuntiva, preparação da imuno-histoquímica e detalhes da avaliação histopatológica.

O segundo capítulo trata de um artigo publicado no periódico *Veterinary Ophthalmology* onde foi comparada a avaliação da sensibilidade corneana induzida após o uso de dois diferentes métodos de mensuração da fração aquosa do filme lacrimal. O animal modelo utilizado nesta pesquisa foi o coelho doméstico. Avaliou-se as alterações da sensibilidade da córnea após o uso do teste lacrimal de Schirmer e após o uso teste lacrimal da ponta de papel (método proposto por Rogério Ribas Lange), e o tempo de recuperação da córnea aos níveis de sensibilidade basais. Por se tratar de um teste não descrito anteriormente para coelhos, determinou-se ainda os valores de normalidade para a espécie.

O terceiro capítulo trata de artigo que será submetido ao periódico *Experimental Eye Research*. No artigo foram estudadas as alterações induzidas na conjuntiva de coelhos saudáveis pelo uso de formulações comerciais antiglaucomatosas análogas de prostaglandina associadas ou não à conservante. Entre as drogas utilizadas foram escolhidas formulações com conservante cloreto de benzalcônio, amônia poliquaternária-1, e drogas sem adição de conservantes. Foram realizados testes clínicos oftálmicos para avaliar alterações na pressão intraocular, sensibilidade da córnea e produção lacrimal; mensurações histomorfológicas de espessura da parede vascular e densidade de células calciformes; e avaliação imuno-histoquímica de macrófagos reativos, linfócitos-T reativos e endotélio vascular reativo. Todos os parâmetros do estudo estão relacionados à resposta inflamatória da conjuntiva durante o uso de drogas antiglaucomatosas.

O quarto capítulo descreve, à semelhança do terceiro, um estudo das alterações induzidas na conjuntiva de coelhos saudáveis, porém com formulações comerciais beta bloqueadoras, inibidores da anidrase-carbônica e combinações fixas de ambos. Entre as drogas utilizadas foram escolhidas formulações com conservante cloreto de benzalcônio, e drogas sem adição de conservantes. Os testes realizados neste estudo foram os mesmos descritos no capítulo três desta pesquisa.

Palavras-chave: Oftalmologia, glaucoma, coelhos, conjuntiva, superfície ocular.

ABSTRACT

This doctoral thesis is divided into four chapters. The first chapter, that will be submitted to *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia Veterinária*, is an introduction which brings a basic information's, in a review format, about details related to rabbit's ophthalmology, pointing some important steps to help another researchers that would like to study ocular surface and conjunctiva. In addition, this chapter brings information about anatomy, basic conjunctival histology, and steps to perform the immunohistochemical analysis.

The second chapter refers to an article already published in the *Veterinary Ophthalmology* journal. This paper compares changes in corneal touch threshold induced by two different methods to evaluate tear production. Rabbit have been used as experimental model. The corneal touch threshold was evaluated after Schirmer tear test and after paper point tear test (proposed by Rogério Ribas Lange), and the time necessary to recover the basal corneal touch threshold were determinate. Additionally, values of both tear tests were evaluated.

The third chapter refers to a paper that will be submitted to *Experimental Eye Research Journal*. In this paper, we evaluate and compare clinical tests, histological and immunohistochemical changes induced by prostaglandin analogues containing benzalkonium chloride, polyquaternium-1 and without preservatives, in the conjunctiva of rabbits. The ophthalmic tests studied were intraocular pressure, corneal touch threshold, Schirmer tear test; histomorphometric analysis were vascular endothelium thickness and conjunctival goblet cells density; and immunohistochemical to detect reactive macrophages, vascular endothelial inflammation and reactive T-lymphocytes. All of these parameters are related to conjunctival inflammatory response during the use of antiglaucoma eye drops.

The fourth chapter describes, like the third chapter, a research that will be submitted to *Experimental Eye Research Journal*. In this paper, we evaluate and compare clinical tests, histological and immunohistochemical changes induced by commercial antiglaucoma beta-blockers, carbonic-anhydrase inhibitor, and fixed combinations, containing benzalkonium chloride, polyquaternium-1 and without preservatives, in the conjunctiva of rabbits. The tests evaluated in this study were the same described in the third chapter.

Keywords: Ophthalmology. Glaucoma, rabbit, conjunctiva, ocular surface.

LISTA DE FIGURAS

- 1.1 – Imagens representativas da conjuntiva palpebral do olho esquerdo de um coelho doméstico da raça Nova Zelândia, saudável e sem lesões. A: Corte longitudinal sobre o eixo axial do bulbo ocular, pálpebra superior e inferior de um coelho, após fixação para preparação histológica. B: Desenho esquemático da imagem “A” evidenciando a região da conjuntiva palpebral (seta azul), conjuntiva bulbar (seta preta) e fórnice (seta vermelha). C: Exposição do fórnice conjuntival superior após leve tração da pálpebra superior do olho esquerdo. D: Em maior magnificação, é possível destacar as regiões de conjuntiva palpebral (seta azul), bulbar (seta preta) e fórnice (seta vermelha).....14
- 1.2 – Figura esquemática da anatomia do sistema de produção e drenagem nasolacrimal de um coelho. Observa-se neste crânio de um coelho adulto da raça Nova Zelândia o trajeto do ducto nasolacrimal (em vermelho), e o sistema multiglandular que participa da produção da lágrima, composto pela (1) glândula superficial da terceira pálpebra; (2) lobo dorsal e (3) lobo ventral da glândula profunda da terceira pálpebra; (4) glândula lacrimal; (5) lobo infra-orbital, (6) lobo orbital e (7) lobo retro-orbital da glândula lacrimal acessória.....15
- 1.3 – Sequência fotográfica ilustrativa da histologia da conjuntiva (H&E). A: Corte histológico do olho de um coelho da raça Nova Zelândia, saudável e sem lesões. É possível observar à direita da imagem a presença das pálpebras superior e inferiores, ligadas ao bulbo ocular pela conjuntiva. B: Em destaque (20x), a conjuntiva que reveste o bulbo ocular pode ser subdividida em conjuntiva bulbar (seta vermelha), no limite do tecido corneano; fórnice (seta preta), fazendo um ângulo entre a córnea (mais dorsal) e a conjuntiva palpebral (mais ventral); e a conjuntiva palpebral (seta azul). C e D: Em aumento (400x), observa-se o padrão celular histológico da conjuntiva, evidenciando (1) células caliciformes, (2) camada epitelial, (3) estroma subjacente, (4) linfócitos e (5) capilar.....17
- 1.4 – Histologia da conjuntiva de coelho (aumento de 400x) corada com dois tipos diferentes de corantes para observação das células caliciformes. A: Conjuntiva corada com hematoxilina & eosina, evidencia a presença de células caliciformes pelo seu arcabouço, com aspecto transparente (seta vermelha). B: Conjuntiva corada por ácido periódico de Schiff (PAS) permite observar as células caliciformes mais facilmente, sendo identificadas pelo contraste púrpura intenso (seta preta).....18
- 1.5 – Fotomicrografias da conjuntiva de um coelho da raça Nova Zelândia, saudável e sem lesões. (H&E). A: Corte histológico da região do fórnice conjuntival (20x), evidenciando a presença de quatro folículos linfoides bem desenvolvidos (setas vermelhas). B: Em destaque, é possível

- observar duas estruturas globóides, com conteúdo multicelular com acentuado padrão eosinofílico. C: Em aumento (400x), a região de folículos linfóides predomina quase a totalidade da figura, sendo composta por múltiplos linfócitos, delimitados à margem superior pelo epitélio da conjuntiva e células caliciformes (*)......20
- 1.6 – Sequência da técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA). A: Caixa receptora da matriz TMA subdividida em linhas e colunas identificadas por letras e números. B: Seleção dos blocos doadores para coleta das áreas representativas de interesse. C: Exemplo de um bloco doador com duas áreas coletadas (setas vermelhas) da conjuntiva palpebral e bulbar do olho de um coelho. D: Montagem do bloco de TMA com as amostras coletadas e uma amostra coringa (seta azul) de identificação do sentido da leitura. E: Processo de coloração imuno-histoquímica nas lâminas preparadas com o novo bloco de TMA. F: Leitura em microscópio óptico das amostras.....22
- 1.7 – Fotomicrografia da conjuntiva saudável (A) e com resposta inflamatória vascular (B) de coelhos, corada imuno-histoquimicamente com VCAM-1 (aumento 400x). A: Observe a contra-coloração azul, predominante em quase todo o estroma subjacente, com vasos sanguíneos não reativos (setas pretas). B: Entre a contra-coloração azul do estroma, destaca-se a presença de uma coloração castanha, positiva para VCAM-1, no tecido vascular (setas vermelhas) e perivascular.....23
- 1.8 – Fotomicrografia da conjuntiva saudável (A) e com resposta de linfócitos-T reativos (B) de coelhos, corada imuno-histoquimicamente com CD45RO (aumento 400x). A: Observe os linfócitos (setas pretas) não reativos ao CD45RO delimitados entre o epitélio e o estroma subjacente da conjuntiva. B: A coloração castanha, positiva para CD45RO, pode ser notada sobre e ao redor dos linfócitos reativos (setas vermelhas).....24
- 1.9 – Fotomicrografia da conjuntiva saudável (A) e com degranulação de macrófagos reativos (B) de coelhos, corada imuno-histoquimicamente com RAM11 (aumento 400x). A: A contra-coloração azul predominante do estroma adjacente foi fracamente marcada pelo anticorpo anti-RAM11. B: A ação de macrófagos reativos resulta em reação positiva para RAM11, deixando o estroma marcado com a coloração castanha (setas vermelhas).....25
- 2.1 – Olho esquerdo de um coelho albino da raça Nova Zelândia, macho, de seis meses de idade. A: Teste lacrimal de Schirmer inserido no fórnice da pálpebra inferior. B: Teste lacrimal da ponta de papel inserido no fórnice da pálpebra inferior do mesmo animal.....33

- 2.2 – Diferença entre os valores médios do teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) e teste lacrimal de Schirmer (TLS) realizado em 10 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, mensurados durante um minuto.....35
- 2.3 – Curva do limiar de toque da córnea (LTC) médio mensurado pela Estesiometria (cm) nos diferentes intervalos de tempo (min.) em 10 coelhos saudáveis da raça Nova Zelândia, nas condições de Controle, condição de teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) e condição de teste lacrimal de Schirmer (TLS). Quanto maior o LTC maior a sensibilidade corneana ao toque. *Indica diferença significativa entre o TLS e ambos TLPP e condição controle. **Indica diferença significativa entre TLS e a condição controle apenas.....37
- 3.1 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (200x) coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). A densidade de células caliciformes (cabeça de seta preta) foram maiores nos olhos esquerdos tratados (B,D,F,H,J,M) do que nos olhos direito não-tratados (A,C,E,G,I,L). A e B se referem à droga latanoprost^{BAK}. C e D à bimatoprost^{BAK}. E e F à travoprost^{BAK}. G e H à travoprost^{PQ}. I e J à tafluprost^{BAKFREE}. L e M à solução controle^{BAK}.....55
- 3.2 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-RAM11. A e B se referem à droga bimatoprost^{BAK}. C e D à latanoprost^{BAK}. E e F à travoprost^{PQ}. G e H à tafluprost^{BAKFREE}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foram mais intensas nos olhos esquerdos (B, D) do que nos olhos direitos (A, C), em contraste com a contra-coloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença em (F,H) e (E,G).....58
- 3.3 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-CD45RO. A e B se referem à droga travoprost^{BAK}. C e D à bimatoprost^{BAK0,005%}. E e F à travoprost^{PQ}. G e H à solução controle^{BAK}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foi maior nos olhos esquerdo (B, D) que nos olhos direito (A, C), em contraste com a contra-coloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença entre (E e F) e (G e H).....60
- 3.4 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-VCAM. A e B se referem à droga travoprost^{BAK}. C e D à Travoprost^{PQ}. E e F à solução controle^{BAK}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foi maior no olho esquerdo (B) que no direito (A), em contraste com a contra-coloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença entre as comparações de (C e D) e (E e F)...62

- 4.1 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (200x) coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). A densidade de células calciformes (cabeça de seta preta) foram semelhantes nos olhos esquerdos tratados (B,D,F,H,J,M) aos olhos direito não-tratados (A,C,E,G,I,L). A e B se referem à dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D à dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}. E e F à brinzolamida 1% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. G e H à brimonidina 0,2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. I e J à solução controle^{BAK}.....84
- 4.2 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-RAM11. A e B se referem à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D solução controle^{BAK}. E e F à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foram mais intensas nos olhos esquerdos (B, D) do que nos olhos direitos (A, C), em contraste com a contra-coloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença em (E e F).....86
- 4.3 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-CD45RO. A e B se referem à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}. E e F à solução controle^{BAK}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foi maior no olho esquerdo tratado (B) que no olho direito não-tratado (A), em contraste com a contra-coloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença entre (C e D) e (E e F).....88
- 4.4 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-VCAM. A e B se referem à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D à brinzolamida 1% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. E e F à solução controle^{BAK}. Não é possível diferenciar a densidade da resposta imune (áreas castanhas em contraste com a contra-coloração de eosina - azul) dos olhos tratados (B, D e F) em relação aos não tratados (A, C e E)...90

LISTA DE TABELAS

- 2.1 – Valores médios (em cm) do limiar de toque da córnea (LTC) mensurados nas condições de controle, condição de teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) e condição de teste lacrimal de Schirmer (TLS), estudados em coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) numa sequência cronológica.....37
- 3.1 – Drogas oftálmicas utilizadas para o tratamento do olho esquerdo de coelhos brancos da raça Nova Zelândia, de acordo com o respectivo número de animais (N) e o nome comercial do produto.....48
- 3.2 – Valores da sensibilidade da córnea (SC) observados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP.....52
- 3.3 – Valores do teste lacrimal de Schirmer (TLS) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP em milímetros, durante o intervalo de 1 minuto.....53
- 3.4 – Valores da pressão intra-ocular (PIO) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP.....53
- 3.5 – Comparação da densidade de células caliciformes (média \pm DP) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas.....54
- 3.6 – Comparação da espessura da parede vascular (EPV) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em μm56
- 3.7 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-RAM11 entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em somatório de áreas em μm^257
- 3.8 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-CD45RO entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em somatório de áreas em μm^259

3.9	–	Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-VCAM entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em somatório de áreas em μm^2	61
4.1	–	Drogas oftálmicas utilizadas para o tratamento do olho esquerdo de coelhos brancos da raça Nova Zelândia, de acordo com o respectivo número de animais (N) e o nome comercial do produto.....	77
4.2	–	Valores da sensibilidade da córnea (SC) observados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média ± DP.....	81
4.3	–	Valores do teste lacrimal de Schirmer (TLS) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média ± DP em milímetros, durante o intervalo de 1 minuto.....	82
4.4	–	Valores da pressão intraocular (PIO) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média ± DP.....	82
4.5	–	Comparação da densidade de células caliciformes (média ± DP) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas.....	83
4.6	–	Comparação da espessura da parede vascular (EPV) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em μm	85
4.7	–	Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-RAM11 entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em somatório de áreas em μm^2	86
4.8	–	Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-CD45RO entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em somatório de áreas em μm^2	87
4.9	–	Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-VCAM entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em somatório de áreas em μm^2	89

LISTA DE ABREVIATURAS

APG – Análogos de prostaglandina.

ARVO – *Association for Research in Vision and Ophthalmology*.

BAK – *Benzalkonium chloridre*, termo em inglês para cloreto de benzalcônio.

BAKFREE – termo em inglês para definir a ausência de cloreto de benzalcônio.

CD45RO – Subunidade heterogênea intracelular CD45 de linfócitos.

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais.

DP – Desvio padrão.

H&E – Hematoxilina & eosina.

IHQ – Imuno-histoquímica.

LTC – Limiar de toque da córnea.

MSD – Merck Sharp & Dohme

N – Número.

OD – Olho direito.

OS – Olho esquerdo.

PAS – Ácido periódico de Schiff.

PIO – Pressão intraocular.

PQ – Amônia poliquaternária-1.

PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

RAM11 – *Rabbit Anti-Macrophage*.

SC – Sensibilidade corneana.

TLFV – Teste lacrimal fenol vermelho.

TLS – Teste lacrimal de Schirmer.

TLSm – Teste lacrimal de Schirmer modificado.

TLPP – Teste lacrimal da ponta de papel.

TLOAC – Tecido linfóide organizado associado à conjuntiva.

TMA – *Tissue microarray* - arranjo em matriz de amostras teciduais.

UFPR – Universidade Federal do Paraná.

VCAM-1 – *Vascular Cellular Adesion Molecule*.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO – 1: ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA SUPERFÍCIE OCULAR DE COELHOS: UM GUIA PARA A OFTALMOLOGIA COMPARADA	15
1.1 INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
1.2 REFERÊNCIAS.....	25
2. CAPÍTULO – 2: COMPARAÇÃO ENTRE DA SENSIBILIDADE CORNEANA INDUZIDA PELO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER E TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL EM COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA	29
2.1 INTRODUÇÃO	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.3 RESULTADOS	34
2.4 DISCUSSÃO	37
2.5 REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.
3. CAPÍTULO – 3: COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DA CONJUNTIVA DE COELHOS INDUZIDAS PELO USO DE ANÁLOGOS DE PROSTAGLANDINA, COM E SEM CONSERVANTES	44
Erro! Indicador não definido. 3.1 INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.3 RESULTADOS	52
3.5 DISCUSSÃO	63
3.6 REFERÊNCIAS.....	68
4. CAPÍTULO – 4: COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DA CONJUNTIVA DE COELHOS INDUZIDAS PELO USO DE BETA BLOQUEADORES, INIBIDORES DA ANIDRASE CARBÔNICA, ALFA AGONISTAS E COMBINAÇÕES FIXAS DE AMBOS, COM E SEM CONSERVANTES	73
Erro! Indicador não definido. 4.1 INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
4.3 RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.4 DISCUSSÃO	91
4.5 REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.
5. ANEXOS	100

1. CAPÍTULO – 1

ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA SUPERFÍCIE OCULAR DE COELHOS: UM GUIA PARA A OFTALMOLOGIA COMPARADA

1.1 INTRODUÇÃO

Anatomia da conjuntiva do coelho

A conjuntiva é uma membrana mucosa que reveste a face interna das pálpebras, toda a terceira pálpebra e recobre a superfície anterior do olho até o limite do limbo, ao redor da córnea (Figura 1.1). Didaticamente é dividida em conjuntiva bulbar (que recobre o bulbo ocular) e conjuntiva palpebral, todavia, trata-se de uma membrana contínua de revestimento, cabendo a divisão um aspecto meramente didático.^{1,2} A região de junção, ou reflexão da conjuntiva forma um fundo de saco, denominado “fórnice”.^{2,4}

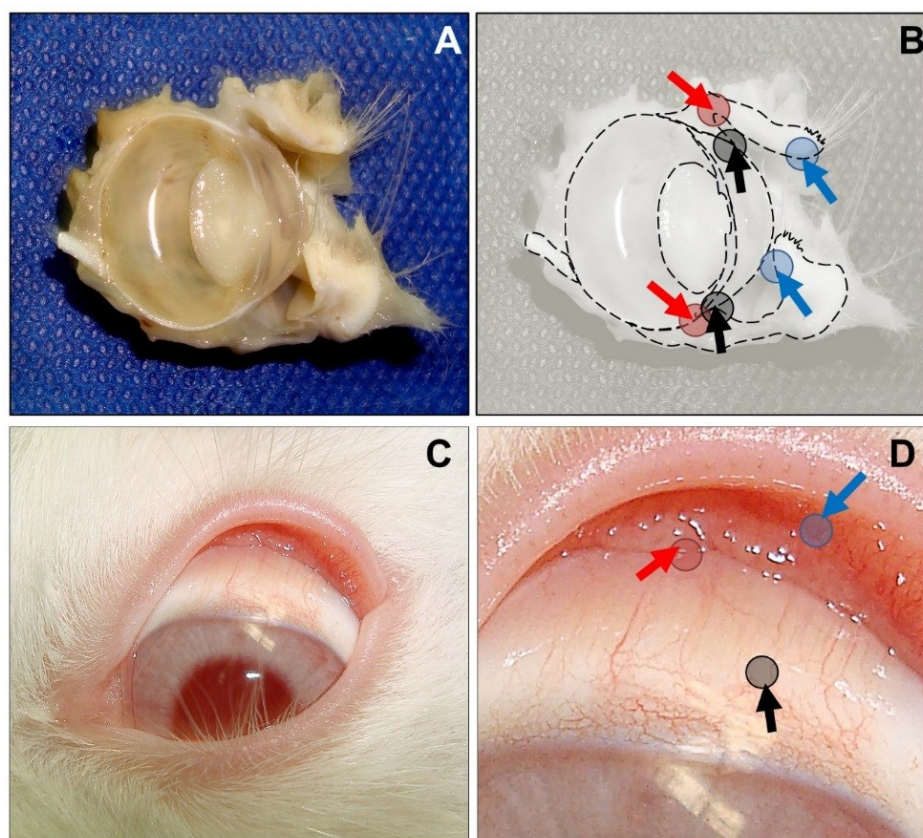


Figura 1.1 – Imagens representativas da conjuntiva palpebral do olho esquerdo de um coelho doméstico da raça Nova Zelândia, saudável e sem lesões. A: Corte longitudinal sobre o eixo axial do bulbo ocular, pálpebra superior e inferior de um coelho, após fixação para preparação histológica. B: Desenho esquemático da imagem “A” evidenciando a região da conjuntiva palpebral (seta azul), conjuntiva bulbar (seta preta) e fôrnice (seta vermelha). C: Exposição do fôrnice conjuntival superior após leve tração da pálpebra superior do olho esquerdo. D: Em maior magnificação, é possível destacar as regiões de conjuntiva palpebral (seta azul), bulbar (seta preta) e fôrnice (seta vermelha).

Os coelhos possuem cílios verdadeiros em ambas as pálpebras superior e inferior, sendo a região central da pálpebra superior a área em que se concentram os cílios de maior comprimento. No limite da margem palpebral, o epitélio da epiderme gradualmente se modifica em um tecido de conjuntiva, sendo a estrutura de transição denominada margem, que é constituída pela placa tarsal, glândulas tarsais e ponto lacrimal.^{4,5}

Os coelhos possuem apenas um único ponto lacrimal que faz a drenagem da lágrima pelo ducto nasolacrimal, e um sistema de produção da lágrima envolve um complexo multiglandular (Figura 1.2).

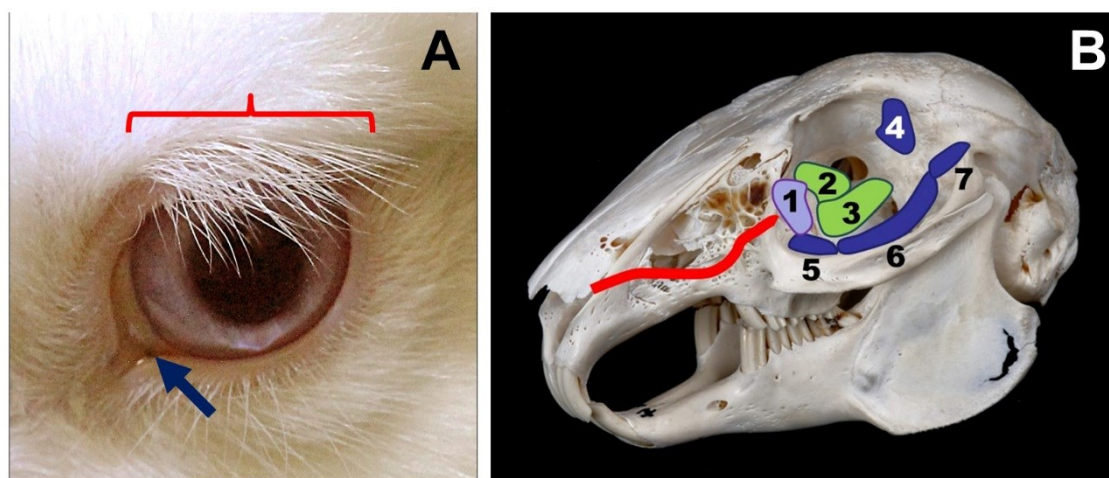


Figura 1.2 – Figura esquemática da anatomia dos anexos e sistema de produção e drenagem nasolacrimal de um coelho adulto da raça Nova Zelândia. A: Olho esquerdo, evidenciando a presença de cílios bem desenvolvidos na região central da pálpebra superior (chave vermelha), e o ponto lacrimal único (seta azul). B: Observa-se neste crânio o trajeto do ducto nasolacrimal (em vermelho), e o sistema multiglandular que participa da produção da lágrima, composto pela (1) glândula superficial da terceira pálpebra; (2) lobo dorsal e (3) lobo ventral da glândula profunda da terceira pálpebra; (4) glândula lacrimal; (5) lobo infra-orbital, (6) lobo orbital e (7) lobo retro-orbital da glândula lacrimal acessória.

Macroscopicamente o tecido conjuntival possui aspecto avermelhado homogêneo e brilhante nas margens palpebrais, revestindo também a membrana nictitante (terceira pálpebra) e coloração avermelhada tendendo a um amarelo semitransparente brilhante ao redor do bulo ocular. A presença de pigmentação conjuntival é variável de acordo com a espécie animal, sendo inexistente em coelhos albinos da Raça Nova Zelândia.^{6,7}

A aderência do tecido conjuntival encontra-se firmemente ligada às pálpebras e membrana nictitante, frouxamente aderida ao bulbo ocular, encontrando-se livre na região do fórnice. Devido a estas características, observa-se que as inflamações conjuntivais podem causar um edema (quemose)

mais pronunciado na região de fórnice e sobre o bulbo ocular, do que propriamente na face interna das pálpebras.⁴

A conjuntiva facilita o livre movimento do bulbo ocular e promove uma superfície lisa para que as pálpebras deslizem sobre a córnea. A inervação sensorial é mediada via divisão oftálmica do nervo trigêmeo, assim como ocorre na córnea. A vascularização é predominantemente originada de ramos orbitários com presença de anastomoses do sistema facial, sendo a principalmente irrigadas pela carótida. A conjuntiva tem um importante papel na proteção do olho contra agentes infecciosos.^{4,7}

Uma breve revisão da histologia da conjuntiva de coelhos poderá auxiliar na interpretação dos resultados observados nos capítulos referentes à pesquisa.

Histologia da conjuntiva

A conjuntiva é composta por uma camada epitelial e de um estroma subjacente (Figura 1.3). Na camada epitelial encontram-se as células caliciformes (Figura 1.3D), responsáveis pela produção e secreção de mucina (componente mucoso do filme lacrimal). Outras glândulas conjuntivais contribuem ainda na formação das frações aquosa e lipídica do filme lacrimal.⁴

O epitélio da conjuntiva possui um padrão estratificado cilíndrico, formado por três a sete camadas de células, sobrepostas sobre uma membrana basal.^{3,7} À medida que se aproximam da superfície, as células tornam-se mais achatadas, principalmente nas proximidades do limbo, margem palpebral, onde formam um epitélio estratificado pavimentoso não queratinizante.^{3,7}

As células caliciformes estão presentes entre as camadas superficial e média das células epiteliais (especialmente nos fórnices e na membrana nictitante, mas ausentes no limbo).^{8,9}

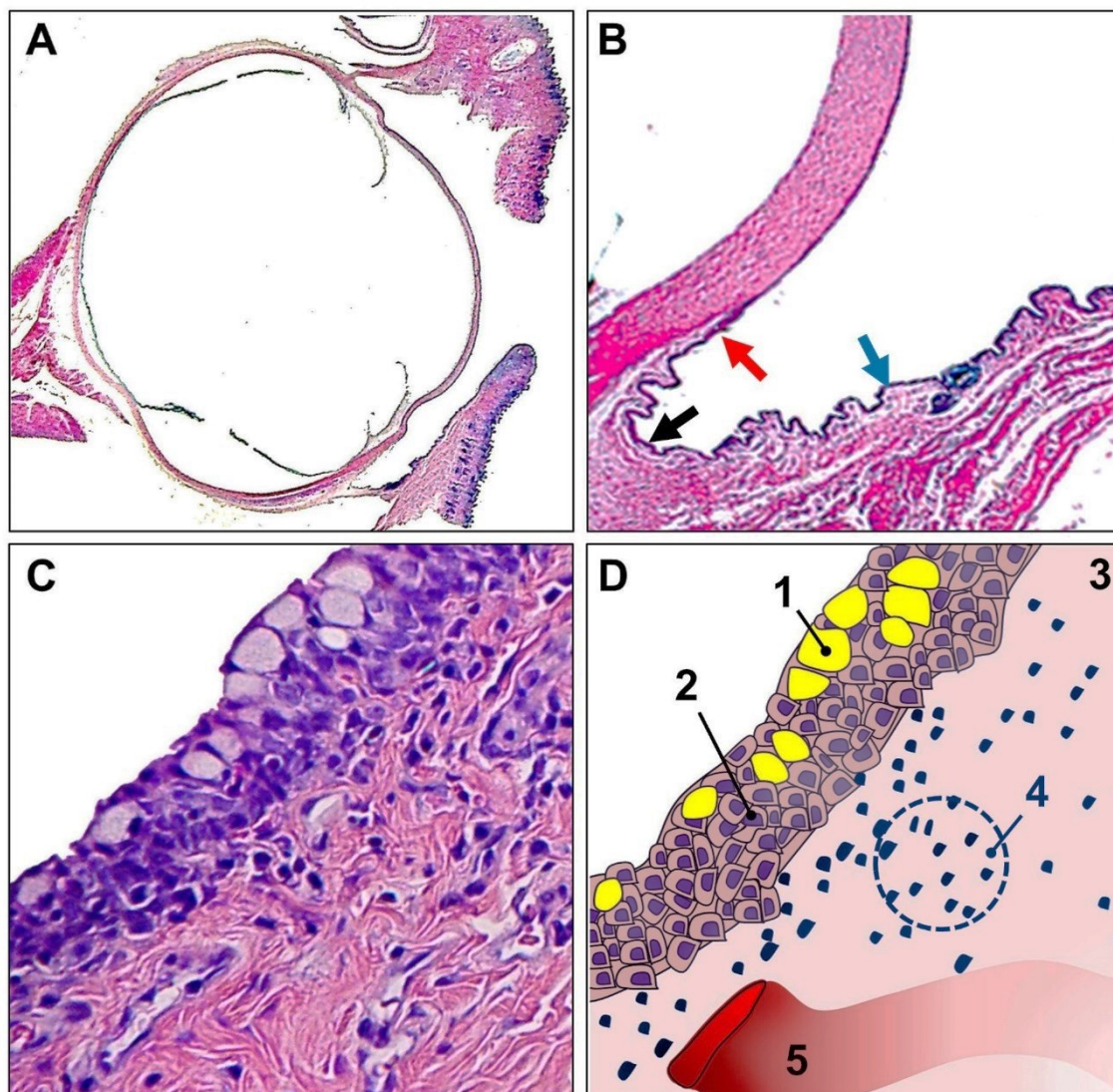


Figura 1.3 – Sequência fotográfica ilustrativa da histologia da conjuntiva (H&E). A: Corte histológico do olho de um coelho da raça Nova Zelândia, saudável e sem lesões. É possível observar à direita da imagem a presença das pálpebras superior e inferiores, ligadas ao bulbo ocular pela conjuntiva. B: Em destaque (20x), a conjuntiva que reveste o bulbo ocular pode ser subdividida em conjuntiva bulbar (seta vermelha), no limite do tecido corneano; fórnice (seta preta), fazendo um ângulo entre a córnea (mais dorsal) e a conjuntiva palpebral (mais ventral); e a conjuntiva palpebral (seta azul). C e D: Em aumento (400x), observa-se o padrão celular histológico da conjuntiva, evidenciando (1) células caliciformes, (2) camada epitelial, (3) estroma subjacente, (4) linfócitos e (5) capilar.

O uso da coloração com ácido periódico de Schiff (PAS), um corante de cor púrpura (Figura 1.4), pode ser realizado como opção para evidenciar as células caliciformes.⁴ Trata-se de uma coloração usada para contrastar estruturas contendo uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos), tipicamente encontrados em tecidos conjuntivos, muco e lâminas basais.⁴

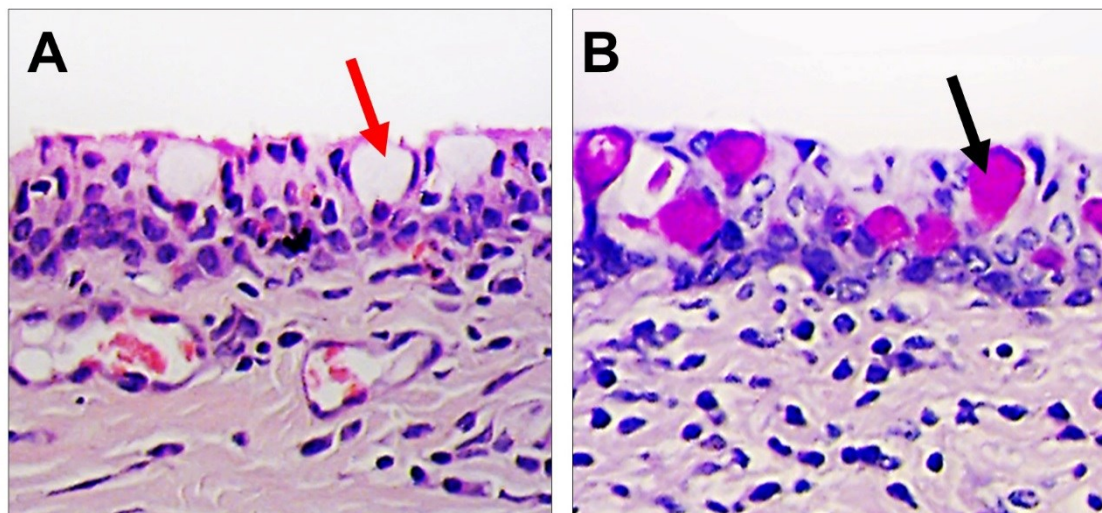


Figura 1.4 – Histologia da conjuntiva de coelho (aumento de 400x) corada com dois tipos diferentes de corantes para observação das células caliciformes. A: Conjuntiva corada com hematoxilina & eosina, evidencia a presença de células caliciformes pelo seu arcabouço, com aspecto transparente (seta vermelha). B: Conjuntiva corada por ácido periódico de Schiff (PAS) permite observar as células caliciformes mais facilmente, sendo identificadas pelo contraste púrpura intenso (seta preta).

Entre o epitélio e o estroma subjacente existe a presença de uma camada basal, onde é possível detectar melanócitos, produtores de pigmento melânico, que à semelhança dos melanócitos da pele, transferem grânulos de melanina (melanosomas) para as células epiteliais adjacentes.⁹ Nos animais albinos, como os coelhos brancos da raça Nova Zelândia, não há produção de melanina.⁶

O estroma localizado abaixo da membrana basal é um tecido conjuntivo fibrovascular que possui grande variedade de células e tecidos (muscular, nervoso, vascular, melanocítico), bem como glândulas lacrimais acessórias.^{4,7} Folículos linfáticos com centros germinativos também se encontram no estroma, principalmente nos fórnices. As células do sistema imunológico mais abundantes no estroma são os linfócitos-B e linfócitos-T, os quais desempenham um importante papel na resposta imunológica da conjuntiva.¹⁰

Resposta imunológica da conjuntiva

Existem diferentes tipos de agentes etiológicos que podem causar alterações na resposta fisiológica normal da conjuntiva, resultando em alterações como irritação e inflamação.¹¹

A microbiota conjuntival varia de acordo com o habitat e com características inerentes de cada espécie animal.¹² A grande diversidade de bactérias presentes

na microbiota da conjuntiva de mamíferos permanece em condições de homeostase com a saúde ocular.^{13,14} Para manutenção desta homeostase a conjuntiva possui um sistema imuno-secretor principalmente mediado por linfócitos (CD3+) e macrófagos, que quando preciso tornam-se ativos contra possíveis agentes agressores.^{15,16}

Os linfócitos correspondem à grande maioria das células presentes nestas superfícies, são produzidos em regiões específicas denominadas de folículos linfóides (Figura 1.5), apresentando capacidade de circular pelo tecido local para promover uma proteção especializada.^{17,18}

A presença de tecido linfóide organizado associado à conjuntiva (TLOAC) foi descrita anteriormente em pessoas,¹⁹ perus,²⁰ galinhas,²¹ coelhos,^{22,23} porquinhos-da-índia,²⁴ e macacos.²⁵ O TLOAC faz parte do sistema imunológico do organismo, sendo semelhantemente encontrado em tecidos que possuem superfície mucosa como brônquios e intestinos.²⁶

Clinicamente, os folículos linfóides observados na conjuntiva de pessoas e animais podem aumentar na presença de infecções virais, clamidífilose, e menos frequentemente em conjuntivites bacterianas.^{23,27} Um estudo em pessoas que observou a quantidade de folículos linfóides presentes na conjuntiva de pacientes saudáveis com diferentes idades, desde recém nascidos até pessoas idosas de 70 anos; concluiu que a variação média de folículos nestes pacientes era de zero em recém nascidos, com pico de desenvolvimento aos 10 anos de idade, e uma redução lenta e progressiva ao longo da vida.²⁶

Em coelhos, o desenvolvimento dos folículos linfóides ocorre à semelhança de pessoas,²³ se iniciando a partir do nascimento (sem a presença de folículos), até atingir o desenvolvimento máximo, com pico próximo de 6 meses de idade, e um consecutivo declínio ao longo da vida.

Além dos linfócitos e macrófagos descritos anteriormente, o sistema imune conjuntival possui em menor quantidade neutrófilos, os quais estão distribuídos entre o epitélio e estroma subjacente. A distribuição dos linfócitos é desigual, sendo mais numerosos na conjuntiva bulbar e fórnice do que na região da extremidade tarsal.²⁸

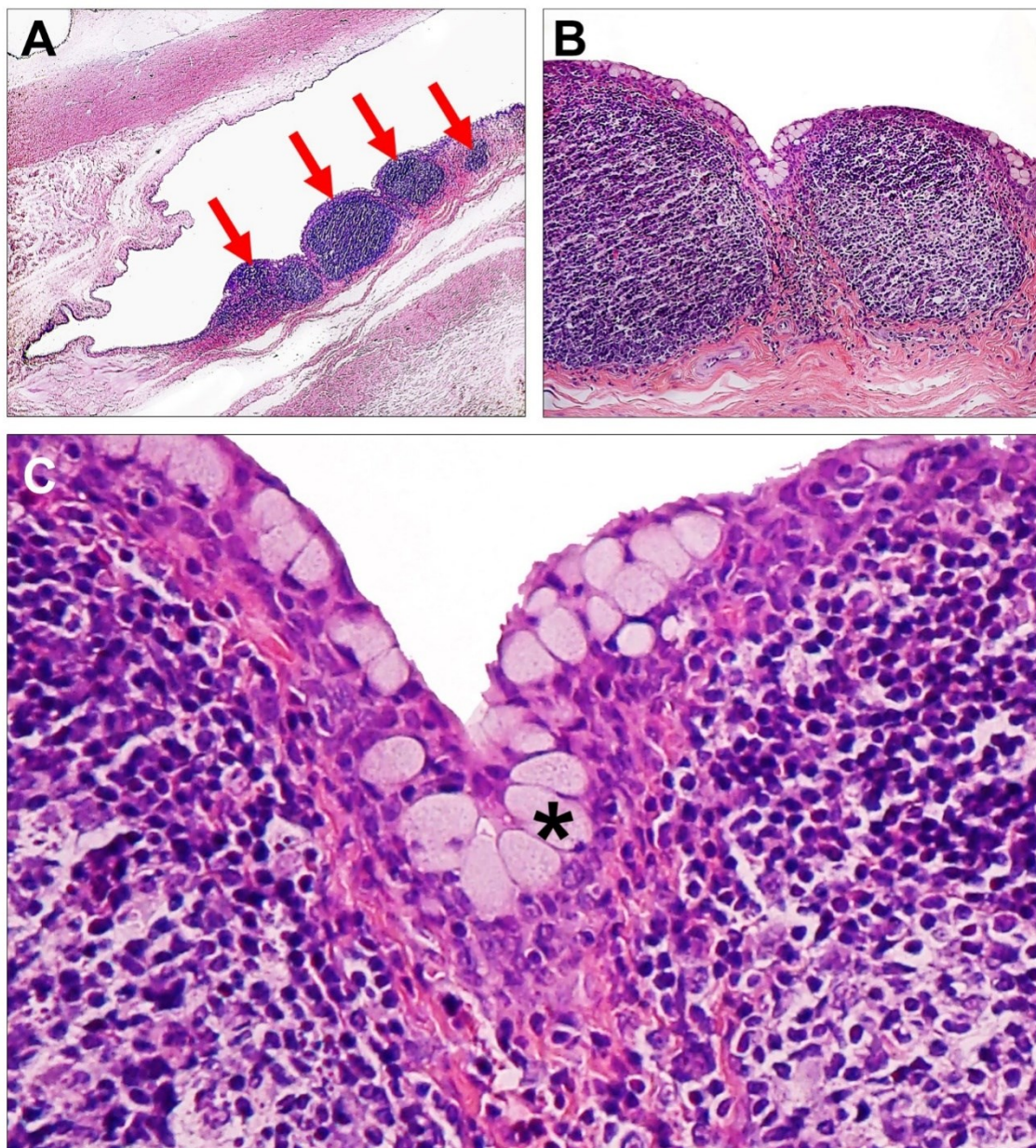


Figura 1.5 – Fotomicrografias da conjuntiva de um coelho da raça Nova Zelândia, saudável e sem lesões. (H&E). A: Corte histológico da região do fórnice conjuntival (20x), evidenciando a presença de quatro folículos linfóides bem desenvolvidos (setas vermelhas). B: Em destaque, é possível observar duas estruturas globóides, com conteúdo multicelular com acentuado padrão eosinofílico. C: Em aumento (400x), a região de folículos linfóides predomina quase a totalidade da figura, sendo composta por múltiplos linfócitos, delimitados à margem superior pelo epitélio da conjuntiva e células calciformes(*)

Os folículos linfóides primordiais, ou primários, contêm linfócitos-B maduros os quais são responsáveis pela produção de imunoglobulinas.²⁸ O mecanismo de migração dos linfócitos ativos para o meio externo à conjuntiva ocorre pela indução de linfócitos-T, os quais são capazes de identificar e reconhecer organismos patogênicos na conjuntiva, sendo responsáveis pela ativação de linfócitos B através da migração para o interior do folículo germinativo

linfocitário.²⁷ A ativação destes linfócitos-B resulta na diferenciação do folículo de primário para secundário, que por sua vez inicia a proliferação de linfoblastos e linfócitos, capazes de se deslocarem para atingir o sítio de ação na mucosa, amplificando assim a resposta imunológica local.²⁷

Avaliação imuno-histoquímica da conjuntiva

A detecção da inflamação da conjuntiva, realizada pela imuno-histoquímica (IHQ), se refere ao processo de localizar antígenos específicos de determinados marcadores, explorando o princípio da ligação específica antígeno-anticorpos.²⁹ Com o intuito de propiciar ao leitor noções básicas da metodologia, serão descritos os principais passos da preparação do material da imuno-histoquímica.

Para uma boa coloração IHQ o antígeno alvo deve permanecer insolúvel e sua estrutura terciária deve estar preservada, permitindo a ligação adequada com o anticorpo. A exposição prolongada das proteínas a amostra ao fixador, pode acarretar em alterações permanentes na amostra, tornado o resultado da análise IHQ insatisfatório ou ineficiente. Desta forma a fixação do material com solução tamponada de formaldeído à 10% deve ser realizada corretamente, respeitando-se o período de 24 a 48 horas de imersão para um consecutivo processamento histotécnico.²⁹

Os marcadores moleculares específicos da inflamação podem ser característicos de eventos celulares particulares, tais como proliferação ou morte celular (apoptose), ou ainda ativação e liberação de determinadas substâncias.³⁰ A visualização de uma interação antígeno-anticorpo pode ser obtida de diversas formas, sendo a mais comum, o uso um anticorpo conjugado a uma enzima peroxidase, que catalisa uma reação que produzirá coloração.³⁰

A coloração produzida pelo anticorpo sofre precipitação direta no corte histológico da amostra analisada, gerando a formação de um padrão de cor castanho ou avermelhado, que reflete a distribuição do antígeno alvo no tecido/célula analisado.^{29,30} Esta coloração é contrastada com uma contra-coloração de fundo, frequentemente de padrão azul.³⁰

O uso da IHQ apresenta grande vantagem pela alta sensibilidade e especificidade dos marcadores, necessitando de pequenas quantidades de tecido para detecção do antígeno, com pequeno volume de anticorpo.

Entretanto, como desvantagem é possível destacar um prolongado processamento histotécnico não automatizado da amostra, que frequentemente apresenta elevado custo. Na tentativa de obter um melhor resultado IHQ com um custo acessível, a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA) pode ser utilizada.^{30,31}

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica descrita em 1998 por Kononen com ampla aceitação pela literatura mundial. Trata-se da construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais obtidos de dezenas de blocos de parafina.³²

Para a construção de um bloco de TMA existe uma série de passos que devem ser realizados, como a elaboração de um croqui gabarito, que descreve o posicionamento correto de cada amostra no novo bloco; a seleção dos locais de coleta (dos blocos doadores), representativas da área de interesse a ser estudada; a construção do bloco receptor; a obtenção das lâminas;^{32,33} e finalmente a avaliação e interpretação dessas para os estudos (Figura 1.6).



Figura 1.6 – Sequência da técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA). A: Caixa receptora da matriz TMA subdividida em linhas e colunas identificadas por letras e números. B: Seleção dos blocos doadores para coleta das áreas representativas de interesse. C: Exemplo de um bloco doador com duas áreas coletadas (setas vermelhas) da conjuntiva palpebral e bulbar do olho de um coelho. D: Montagem do bloco de TMA com as amostras coletadas e uma amostra coringa (seta azul) de identificação do sentido da leitura. E: Processo de coloração imunohistoquímica nas lâminas preparadas com o novo bloco de TMA. F: Leitura em microscópio óptico das amostras.

Deteccção de inflamação da conjuntiva

Ao entrar em contato com o antígeno, a conjuntiva ativa uma cascata inflamatória em resposta ao patógeno, liberando uma série de citocinas e mediadores químicos que promovem alterações vasculares, edema e recrutamento de células do sistema imune local.³⁴

A resposta inflamatória da conjuntiva ativa uma proteína CD106 no endotélio vascular, a qual contribui ativamente para o extravasamento de linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos para o sítio da inflamação.^{35,36} A ativação desta proteína CD106 ocorre pelo contato ou rolamento de linfócitos sobre o endotélio dos vasos conjuntivais, podendo ser detectada na corrente sanguínea, ou na própria parede do vaso ou ainda no tecido extravascular adjacente.³⁶ A detecção da proteína CD106 é realizada imuno-histoquimicamente por um anticorpo monoclonal de ratos denominado VCAM-1 (*Vascular Cellular Adesion Molecule*).³⁵ O anticorpo anti-VCAM-1 (Novocastra Laboratories Ltd, UK) quando utilizado na conjuntiva de coelhos deve ser preparado na diluição de 1:200 para fornecer uma coloração castanho na intensidade adequada para interpretação, como mostrado na Figura 1.7.

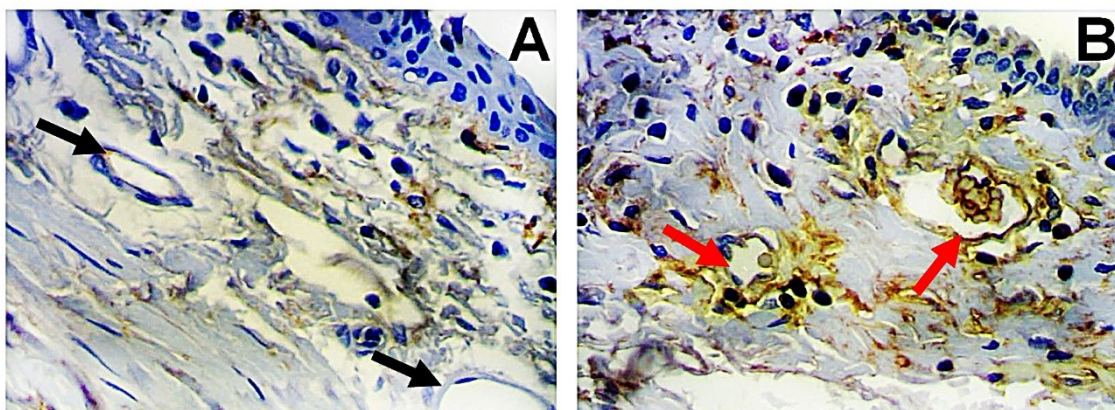


Figura 1.7 – Fotomicrografia da conjuntiva saudável (A) e com resposta inflamatória vascular (B) de coelhos, corada imuno-histoquimicamente com VCAM-1 (aumento 400x). A: Observe a contracoloração azul, predominante em quase todo o estroma subjacente, com vasos sanguíneos não reativos (setas pretas). B: Entre a contracoloração azul do estroma, destaca-se a presença de uma coloração castanha, positiva para VCAM-1, no tecido vascular (setas vermelhas) e perivascular.

Os linfócitos reativos presentes na conjuntiva diferem em parte dos linfócitos presentes na circulação sanguínea do restante do organismo, pois possuem uma subunidade heterogênea intracelular denominada CD45, capaz de ser detectada pela imuno-histoquímica por meio de um anticorpo monoclonal de ratos anti-CD45.³⁷ Existem diversas isoformas de CD45 (CD45RA, CD45RB, CD45RC,

entre outras), sendo possível detectar e diferenciar a presença linfócitos-T reativos, pois são apenas estes que expressam a isoforma CD45RO.^{37,38} Para isso, é utilizado o anticorpo anti-CD45RO (Figura 1.8).

Grande parte da inflamação da conjuntiva de coelhos é mediada por linfócitos reativos, seguidos pela participação de macrófagos em segundo lugar, de forma menos expressiva,³⁴ porém não menos importante. Os macrófagos reativos expressam uma proteína citoplasmática capaz de ser detectada pelo anticorpo monoclonal de coelhos RAM11 (*Rabbit Anti-Macrophage*) (Figura 1.9). A presença escassa de macrófagos na conjuntiva nem sempre permite a detecção dos mesmos, porém a liberação de sua proteína citoplasmática durante a degranulação macrofágica, permite a detecção de sua passagem pelo estroma subjacente,³⁹ por meio do contraste da coloração castanha positiva para RAM11 em relação à contra-coloração azul de fundo.

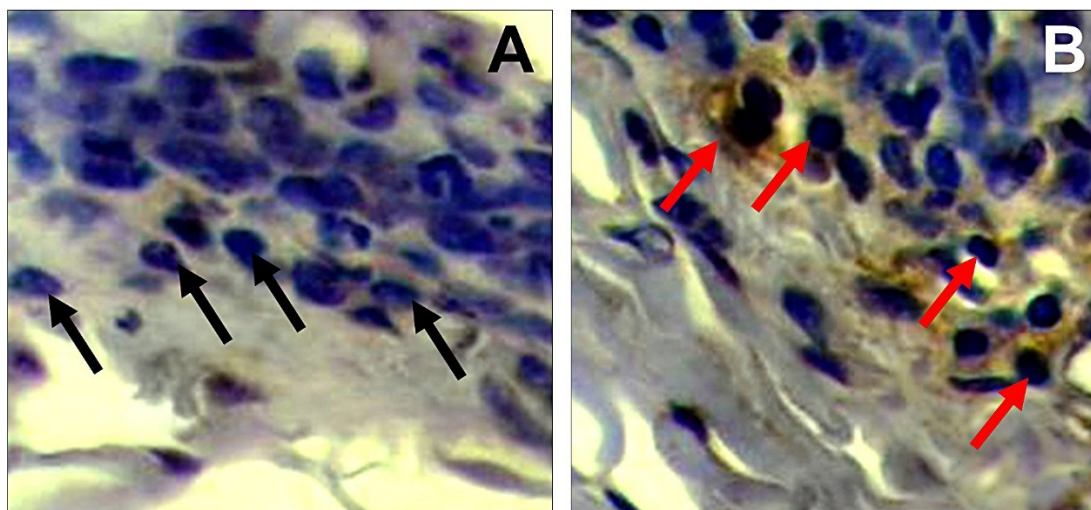


Figura 1.8 – Fotomicrografia da conjuntiva saudável (A) e com resposta de linfócitos-T reativos (B) de coelhos, corada imuno-histoquimicamente com CD45RO (aumento 400x). A: Observe os linfócitos (setas pretas) não reativos ao CD45RO delimitados entre o epitélio e o estroma subjacente da conjuntiva. B: A coloração castanha, positiva para CD45RO, pode ser notada sobre e ao redor dos linfócitos reativos (setas vermelhas).

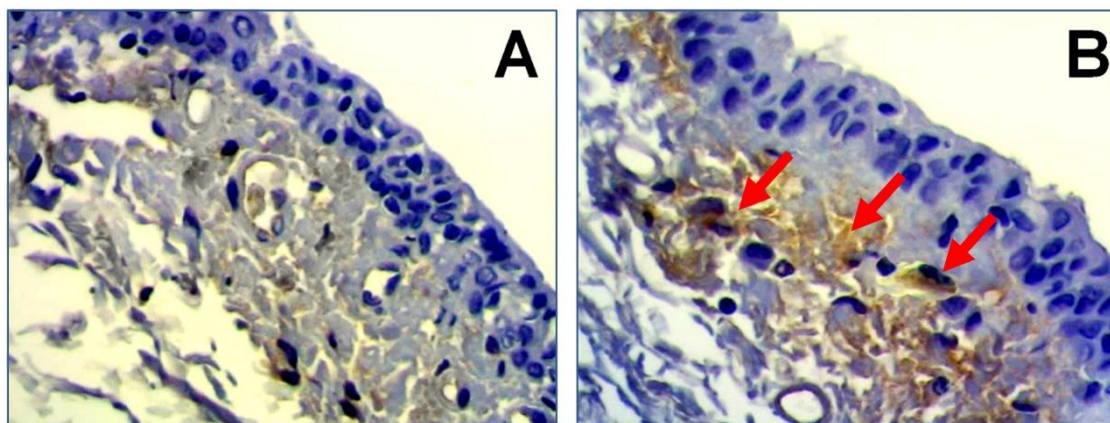


Figura 1.9 – Fotomicrografia da conjuntiva saudável (A) e com degranulação de macrófagos reativos (B) de coelhos, corada imuno-histoquimicamente com RAM11 (aumento 400x). A: A contra-coloração azul predominante do estroma adjacente foi fracamente marcada pelo anticorpo anti-RAM11. B: A ação de macrófagos reativos resulta em reação positiva para RAM11, deixando o estroma marcado com a coloração castanha (setas vermelhas).

1.2 REFERÊNCIAS

1. Berliner ML. The conjunctiva. In: Berliner ML. Biomicroscopy of the eye. (Hoeber PB ed.) New York: Medical Book Department of Harper and Brothers. Vol.I, 1949: 2: 165-183.
2. Dubielzig RR. Diseases of the eyelids and conjunctiva. In: Dubielzig RR, Ketring KL, McLellan GJ, Albert DM. Veterinary ocular pathology: a comparative review. New York: Elsevier. 1.ed. 2010: 7; 143-196.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido conjuntivo. In: Histologia Básica. 11.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008; 5: 66-90.
4. Khan IJ, Ghauri AJ, Hodson J, et al. Defining the limits of normal conjunctival fornix anatomy in a healthy South Asian population. *Ophthalmology*. 2014; 2: 492-497.
5. Chodsh J, Nordquist RE, Kennedy RC. Anatomy of mammalian conjunctival lymphoepithelium. *Advances in Experimental Medical Biology*. 1998; 438: 557-565a.
6. Chodsh J, Nordquist RE, Kennedy RC. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. *Developmental and Comparative Immunology*. 1998; 22: 621-630b.
7. Knopa E, Knopb N. Anatomy and Immunology of the Ocular Surface. In: Niederkorn JY, Kaplan HJ. Immune Response and the Eye. *Chemical Immunology and Allergy*. Basel, Karger, 2007, vol 92: 36-49.
8. Doughty MJ. Functional morphology of mucosal goblet cells based on spatial separation of orifice openings to the surface--application to the rabbit bulbar conjunctiva. *Tissue Cell*. 2014; 46: 241-248.

9. Li N, Deng X, Gao Y, et al. Establishment of the mild, moderate and severe dry eye models using three methods in rabbits. *BMC Ophthalmology* 2013; 13: 13-50.
10. Steven P, Gebert A. Conjunctiva-associated lymphoid tissue - current knowledge, animal models and experimental prospects. *Ophthalmic Research* 2009; 42: 2-8.
11. Cain C, Phillips TE: Developmental changes in conjunctiva-associated lymphoid tissue of the rabbit. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2008; 49: 644–649.
12. Astley RA, Chodosh J, Caire W, Wilson GM: Conjunctival lymphoid follicles in new world rodents. *Anatomy Record (Hoboken)* 2007; 290: 1190–1194.
13. Leigue dos Santos L, Montiani-Ferreira F, Lima L, Lange RR, de Barros Filho IR. Bacterial microbiota of the ocular surface of captive and free-ranging microbats: *Desmodus rotundus*, *Diameus youngi* and *Artibeus lituratus*. *Veterinary Ophthalmology* 2014; 17: 157-161.
14. Lima L, Montiani-Ferreira F, Tramontin M, Leigue dos Santos L, Machado M, Lange RR, Russ HHA. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary Ophthalmology* 2010; 13: 14-25.
15. Latkovic S. Ultrastructure of M cells in the conjunctival epithelium of the guinea pig. *Current Eye Research* 1989; 8: 751–755.
16. Liu H, Meagher CK, Moore CP, Phillips TE: M cells in the follicle-associated epithelium of the rabbit conjunctiva preferentially bind and translocate latex beads. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2005; 46: 4217–4223.
17. Miller MJ, Safrina O, Parker I, Cahalan MD: Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *JExp Med* 2004; 200: 847–856.
18. Knop N, Knop, E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2000; 41: 1270–1279.
19. Duke-Elder S. Diseases of the outer eye. *System of Ophthalmology*. 1965; 3: 45-47.
20. Fix AS, Arp LH. Conjunctiva-associated lymphoid tissue "CALT" in normal and *Bordetella avium*-infected turkeys. *Veterinary Pathology* 1989; 26: 11-129.
21. Fix AS, Arp LH. Morphologic characterization of conjunctiva-associated lymphoid tissue in chickens. *American Journal of Veterinary Research* 1991; 52: 1852-1859.
22. Niimi Y. Studien über den Lymphfollikel in der Conjunctiva. I. Mitt. Über den Lymphfollikel in der Conjunctiva bei normalen Kaninchen. *Acta Soc Ophthal Japan*. 1935; 39: 808-823.
23. Chodosh J, Kennedy R. The Conjunctival Lymphoid Follicle in *Mucosal Immunology. DNA and Cell Biology* 2002; 21: 421-433b.

24. Stock EL, Sobut RA, Roth SI. The uptake of horseradish peroxidase by the conjunctival epithelium of the guinea-pig. *Exp Eye Res.* 1987; 45: 327–337.
25. Ruskell GL. Organization and cytology of lymphoid tissue in the *cynomolgus monkey* conjunctiva. *Anatomy Records* 1995; 243: 153-164.
26. Agnifili L, Mastropasqua R, Fasanella V et al. In vivo confocal microscopy of conjunctiva-associated lymphoid tissue in healthy humans. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2014; 55: 5254-5262.
27. Córdova C, Gutiérrez B, Martínez-García C, et al. Oleonic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis. *PLoS One* 2014; 3: 4-9.
28. Higorani M, Metz D, Lightman SL. Characterization of the normal conjunctival leukocyte population. *Experimental Eye Research* 1997; 64: 905-912.
29. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 2005; 42: 405-426.
30. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *American Journal of Pathology* 2003; 162: 469-477.
31. Andrade V, Cunha IW, Silva EM, et al. Método alternativo para construção de tissue microarrays de baixa densidade e baixo custo. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2005; 3: 109-115.
32. Kononen J. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 1998; 7: 844-847.
33. Sapino A. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Archives* 2006; 3: 288-296.
34. Liu H, Meagher CK, Moore CP, Phillips TE. Antigen sampling M cells in the rabbit conjunctiva. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004; 45: 1505.
35. Shi SR, Gu J, Kaira KL, et al. The monoclonal CD106 vascular cellular adhesion molecule. *Cell Vision.* 1995; 2: 6-22.
36. Stern ME, Gao J, Schwalb TA, et al. Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2002; 43: 2609–2614.
37. Bielory L, Mongia A. Current opinion of immunotherapy for ocular allergy. *Current Opinion of Allergy Clinical Immunology* 2002; 2: 447–452.
38. Paulsen FP, Paulsen JI, Thale AB, et al. Organized mucosa-associated lymphoid tissue in human naso-lacrimal ducts. *Advance Experimental Medical Biology* 2002; 506: 873–876.
39. Wolniak KL, Shinall SM, Waldschmidt TJ. The germinal center response. *Critical Immunology* 2004; 24: 39–65.

2. CAPÍTULO – 2

COMPARAÇÃO ENTRE DA SENSIBILIDADE CORNEANA INDUZIDA PELO TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER E TESTE LACRIMAL DA PONTA DE PAPEL EM COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA.

RESUMO

Objetivos: Avaliar e comparar as diferenças da sensibilidade corneana (SC) induzida por dois diferentes testes lacrimais: teste lacrimal de Schirmer (TLS) e teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) em coelhos brancos da raça Nova Zelândia, determinar o intervalo de tempo necessário para que a córnea estimulada retorne ao estágio de normalidade da SC, e determinar o valor médio da produção lacrimal de coelhos, mensurados pelos TLS e TLPP.

Material e métodos: Um total de 10 coelhos (20 olhos) foram divididos em três etapas de testes com intervalo de 24 horas entre os testes. Para cada etapa foi mensurado o limiar de toque da córnea (LTC) necessário para provocar um reflexo de piscar, durante um intervalo cronológico sequencial, de forma a criar uma curva de LTC (sensibilidade) nos seguintes momentos: tempo zero (referente à primeira mensuração imediatamente antes do teste lacrimal); 1 minuto (segunda mensuração realizada após o teste lacrimal); e consecutivamente nos intervalos 6, 11, 16 e 26 minutos após. As três etapas descritas foram: (1) Condição controle - avaliação LTC durante os intervalos de tempo, sem realização de teste lacrimal; (2) Condição TLPP + LTC, e (3) Condição TLS + LTC. Após a realização dos testes, foi criada uma curva de LTC média nas diferentes condições estudadas.

Resultados: O aumento do LTC foi significativo após o TLS até o período de 16 min, indicando que o TLS pode resultar em desconforto corneano. Não foram observadas diferenças entre o LTC para o TLPP e para a condição controle, indicando que o TLPP causa mínimo desconforto. A média \pm desvio padrão (DP) do TLS foi $5,2 \pm 1,0$ mm/min e do TLPP foi $13,8 \pm 1,5$ mm/min.

Discussão: A fração aquosa da lágrima de coelhos pode ser mensurada de forma eficiente pelo TLPP. Este estudo estabeleceu pela primeira vez os valores de referência do TLPP nesta espécie. A semelhança entre o LTC observado no TLPP e na condição controle demonstra que este teste foi bem tolerado pelos animais. Considerando o conforto do TLPP (em relação ao TLS), à acurácia, e o baixo custo, o TLPP pode ser uma alternativa de método utilizado para mensurar a produção lacrimal em coelhos.

Palavras-chave: Coelhos, limiar de toque da córnea, teste lacrimal da ponta de papel, teste lacrimal de Schirmer, produção lacrimal.

2.1 INTRODUÇÃO

Os médicos veterinários oftalmologistas possuem grande interesse na mensuração da produção lacrimal em animais, especialmente em espécies mamíferos, pois existe uma forte ligação entre a quantidade de lágrimas presente no olho e a saúde ocular. A baixa produção da lágrima (lacrimação), lubrificação inadequada ou mudanças na qualidade do filme lacrimal está associada a uma série de doenças da córnea e da conjuntiva.¹⁻³

A avaliação da produção lacrimal é muito importante para o diagnóstico de muitas oftalmopatias, sendo especialmente utilizada para o diagnóstico da ceratoconjuntivite seca.³ Existe uma diversidade de testes oftálmicos utilizados para mensurar a quantidade da fração aquosa da lágrima, como o teste lacrimal de Schirmer (TLS),^{4,5} teste lacrimal de Schirmer modificado (TLSm),⁶ teste lacrimal fenol vermelho (TLFV),⁷⁻¹¹ e recentemente desenvolvido o teste lacrimal da ponta de papel (TLPP).^{10,11} Na medicina veterinária, a escolha do teste lacrimal adequado está relacionada diretamente ao tipo de espécie animal que será avaliada.

O teste lacrimal de Schirmer (TLS) é o teste mais utilizado em todo o mundo, sendo amplamente utilizado em seres humanos¹² e em uma grande quantidade de espécies animais como cães,^{4,13} gatos,¹⁴ cavalos,¹⁵ chinchilas,⁵ furões,¹⁶ capivaras,¹⁷ macacos,^{18,19} porcos²⁰ e coelhos.²¹ Na experiência dos autores, algumas espécies animais podem apresentar um discreto a leve desconforto ocular durante o TLS, demonstrando sinais variáveis como blefaroespasma ou tentativa em remover a tira de papel do olho. O desconforto causado pela tira de papel do TLS foi descrito em outras espécies animais, como em porquinhos-da-índia, por exemplo.⁸

Em espécies animais que possuem o comprimento palpebral reduzido e que o TLS não se aplica, a utilização do teste lacrimal de Schirmer modificado (TLSm) e do teste lacrimal Fenol Vermelho (TLFV) pode ser indicada. Tanto o TLSm quanto o TLFV demonstraram bons resultados na mensuração da fração aquosa do filme lacrimal, porém, em espécies animais que possuem um comprimento da físsura palpebral muito reduzido, como em saguis por exemplo, a realização destes dois testes pode se tornar um grande desafio, necessitando em alguns casos do auxílio de uma pinça tipo Adson-Brown para a inserção do

teste no fórnice palpebral do animal.¹⁰ Na tentativa de solucionar este problema observado na execução destes testes em espécies como estas, um estudo desenvolveu o teste lacrimal da ponta de papel (TLPP).

O teste lacrimal da ponta de papel utiliza uma haste de papel absorvente endodôntico padronizado (Roeko Color – tamanho 30; Langenau, Alemanha) que pode ser facilmente inserido no fórnice conjuntival.¹⁰ Este teste foi desenvolvido para ser utilizado em espécies animais que possuem olhos muito pequenos, com conseqüente comprimento palpebral reduzido e baixa produção lacrimal. Foi descrito anteriormente em saguis com resultados satisfatórios,¹⁰ e mais recentemente em outras espécies animais como canário-da-terra (*Sicalis flaveola*), curió (*Sporophila angolensis*), tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*), rato (*Rattus norvegicus*) e camundongo (*Mus musculus*).^{10,11}

Durante a execução destas pesquisas, foi observado que os animais do estudo não evidenciavam um desconforto ocular durante o TLPP da mesma forma em que fora observado durante o TLS. Considerando estas observações, o objetivo desta pesquisa foi comparar as diferenças da sensibilidade corneana induzida pelos dois diferentes testes lacrimais: TLS e TLPP em coelhos brancos da raça Nova Zelândia. Durante a avaliação da sensibilidade da córnea, também foi proposto determinar o intervalo de tempo necessário para que a córnea estimulada viesse a se recuperar do estímulo a um estágio de normalidade, e também determinar o valor médio da produção lacrimal em coelhos mensurados pelos TLS e TLPP.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Neste estudo foram utilizados 20 olhos de dez coelhos saudáveis (cinco machos e cinco fêmeas), sendo todos da raça Nova Zelândia com seis meses de idade. Os animais foram selecionados aleatoriamente em uma criação comercial. Todos os procedimentos realizados com os animais foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de uso de animais em experimentação animal da Universidade Federal do Paraná, e de acordo com as normas internacionais da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*).

Os animais foram submetidos ao exame físico geral e avaliação parasitológica, antes da avaliação oftálmica, de forma a excluir àqueles que pudessem apresentar qualquer indicação de doença sistêmica. As estruturas oculares localizadas no segmento anterior foram avaliadas com o auxílio de um transiluminador e um biomicroscópio com lâmpada de fenda (*Hawk Eye; Dioptrix, L'Union, France*). Os coelhos que apresentaram lesões oculares ou sistêmicas foram excluídos deste estudo. Para evitar as diferenças entre diferentes observadores, um único pesquisador foi o responsável por realizar todos os testes oftálmicos.

Testes oftálmicos

A avaliação oftálmica e os testes utilizados foram realizados com os coelhos contidos manualmente pelo mesmo investigador, que continha o animal ao mesmo tempo em que realizada a inserção do teste lacrimal no fórnice da conjuntiva palpebral, tomando-se o cuidado em manter os animais em condição de conforto durante as mensurações. A umidade relativa do ar (70%) e a temperatura do ambiente (22,5%) foram controladas durante a pesquisa.

A mensuração da fração aquosa da lágrima foi realizada utilizando-se os seguintes métodos: teste lacrimal de Schirmer tipo I (TLS) e o teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) (Figura 2.1). O TLS foi realizado utilizando-se uma tira de papel estéril padronizada (Ophthalmos, São Paulo, SP, Brasil) e o TLPP utilizando-se de uma ponta de papel absorvente endodôntica padronizada estéril (*Roeko Color - size 30; Langenau, Alemanha*).²³

O teste da sensibilidade da córnea foi mensurado considerando-se o limiar de toque da córnea (LTC) necessário para provocar um reflexo de piscar. Este LTC foi mensurado por um único pesquisador utilizando-se um estesiômetro de Cochet-Bonnet (*Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, França*) durante um intervalo cronológico sequencial, de forma a criar uma curva de intervalos de LTC (sensibilidade) nos seguintes momentos: tempo zero (referente à primeira mensuração realizada imediatamente antes do teste lacrimal); 1 minuto (segunda mensuração realizada imediatamente após o teste lacrimal); e consecutivamente nos intervalos de 6, 11, 16 e 26 minutos após. Em cada um dos animais, foram avaliados ambos os olhos (esquerdo e direito). Com a finalidade de evitar discrepâncias durante a mensuração do LTC em cada olho,

o olho esquerdo de cada coelho foi avaliado primeiro, sendo o olho direito avaliado consecutivamente com 1 minuto de intervalo; tomando-se o cuidado em respeitar a sequência cronológica dos intervalos em cada olho.

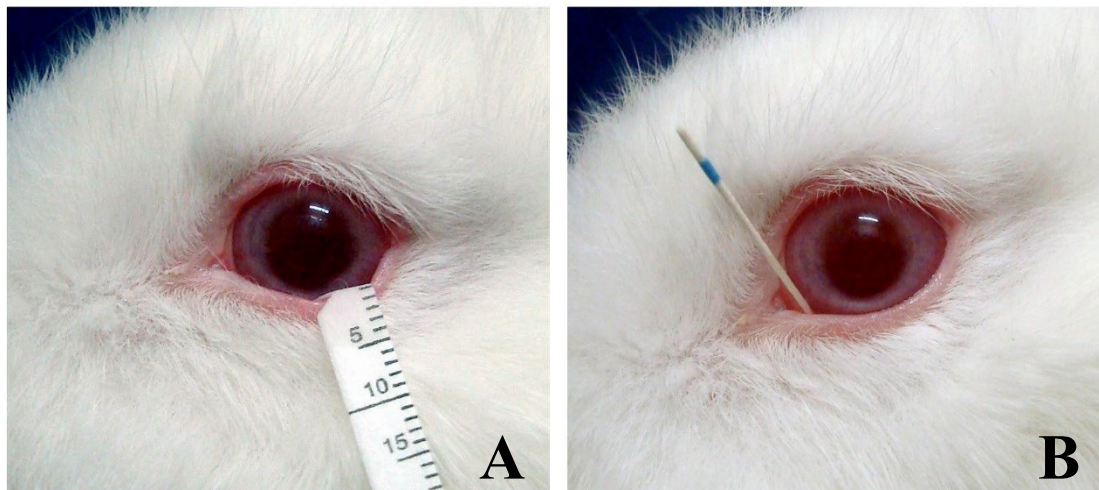


Figura 2.1 – Olho esquerdo de um coelho albino da raça Nova Zelândia, macho, de seis meses de idade. A: Teste lacrimal de Schirmer inserido no fórnice da pálpebra inferior. B: Teste lacrimal da ponta de papel inserido no fórnice da pálpebra inferior do mesmo animal.

Os testes foram conduzidos em três etapas diferentes, com um intervalo de 24 horas entre cada etapa, para se evitar possíveis interferências entre os testes, uma vez que os mesmos coelhos participaram em cada uma das etapas.

A sequência ordenada dos procedimentos realizados neste estudo foi: (1) Condição controle - avaliação do limiar de toque da córnea (LTC) durante os intervalos de tempo, sem a realização de um teste lacrimal; (2) Condição de avaliação do TLPP e LTC, e (3) condição de avaliação do TLS e LTC. Após a realização de cada teste, os valores referentes a cada coelho foram registrados de forma a criar uma curva de LTC médio nas diferentes condições estudadas.

Análise estatística

Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para demonstrar que os erros dos valores da amostra encontravam-se distribuídos dentro da normalidade. Consecutivamente, foi realizado um pós-teste de Tukey HSD sendo considerado significativo os valores com $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software SAS v.9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Foi ainda analisado o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis

quantitativas do TLPP e TLS por meio do software SPSS 11.0 (*Statistical Product and Service Solutions, NY, USA*).

2.3 RESULTADOS

Testes lacrimais

Não houve diferença estatística entre os valores obtidos para os olhos esquerdos (OS) e direitos (OD) para ambos os testes TLPP e TLS ($P > 0,05$). O valor médio com seu respectivo desvio padrão obtido para o TLS nos 20 olhos analisados foi de $5,1 \pm 1,0$ mm/min para o OD e $5,2 \pm 1,0$ mm/min para o OS. A média geral entre ambos os olhos do TLS foi de $5,2 \pm 1,0$ mm/min, com amplitude de 4 a 7 mm/min (variância = 1,18).

O valor médio com seu desvio padrão obtido para o TLPP foi de $14,2 \pm 1,8$ mm/min para o OD e $13,5 \pm 1,2$ mm/min para o OS. A média geral obtida entre ambos os olhos do TLPP foi de $13,8 \pm 1,5$ mm/min, com amplitude de 9,9 a 16,2 mm/min (variância = 2,26).

O coeficiente de correlação de Pearson entre o TLS médio ($5,2 \pm 1,0$ mm/min) e o TLPP médio ($13,8 \pm 1,5$ mm/min) suporta a hipótese de que não há correlação entre ambas as variáveis ($P = 0,283$). Os valores médios do TLS e do TLPP podem ser visualizados na figura 2.2 a seguir.

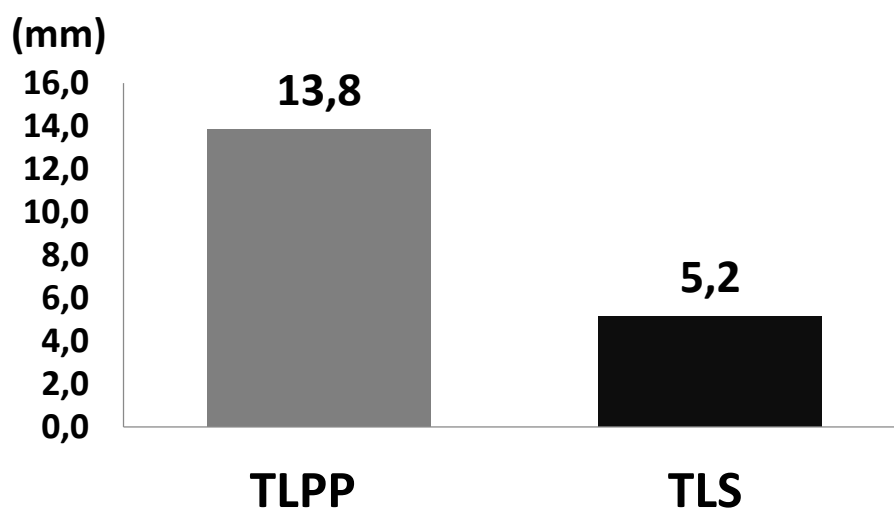


Figura 2.2 – Diferença entre os valores médios do teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) e teste lacrimal de Schirmer (TLS) realizado em 10 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, mensurados durante um minuto.

Sensibilidade corneana

Condição controle

A média geral \pm desvio padrão do LTC na condição controle foi de $2,62 \pm 0,68$ cm. Uma comparação entre os valores médios de LTC observados nos intervalos de tempo não apresentou uma diferença significativa ($P > 0,05$). Todos os valores mensurados em cada um dos intervalos da sequência cronológica nas condições controle, TLPP e TLS podem ser observados na Tabela 2.1.

TLPP e LTC

Não houve diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito em nenhuma das avaliações mensuradas ($P > 0,05$) entre os intervalos. O valor médio do LTC mensurado antes do TLPP (tempo zero) foi de $2,73 \pm 0,77$ cm, não sendo observado diferença significativa entre o valor de LTC na condição controle no mesmo período $2,63 \pm 0,63$ cm ($P = 0,8437$). Imediatamente após o TLPP (1 minuto) a média com seu desvio padrão foi de $2,95 \pm 0,78$ cm, não sendo observado novamente diferença significativa na comparação do LTC para o mesmo período na condição controle $2,63 \pm 0,65$ cm ($P = 0,1227$). Os demais valores de LTC observados durante toda a sequência cronológica do exame (6, 11, 16 e 26 minutos) não demonstraram diferença significativa quando comparados aos respectivos períodos da condição controle ($P > 0,05$).

TLS e LTC

Não houve diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito em nenhuma das avaliações mensuradas ($P > 0,05$) entre os intervalos. O limiar de toque da córnea (LTC) mensurado no tempo zero foi de $2,73 \pm 0,72$ cm, não apresentando diferença significativa entre o mesmo momento na condição controle $2,63 \pm 0,63$ cm ($P > 0,05$) e na condição do TLPP $2,73 \pm 0,72$ cm ($P = 0,6263$). O LTC de $3,68 \pm 0,52$ cm observado imediatamente após o TLS (1 minuto) foi significativamente maior que o valor observado durante o mesmo intervalo na condição controle $2,63 \pm 0,65$ cm ($P < 0,0001$) e durante o TLPP

2,95 ± 0,78 cm ($P = 0,0009$). Aos seis minutos, o LTC médio foi de 3,60 ± 0,48 cm sendo significativamente maior que a condição controle 2,63 ± 0,70 cm ($P < 0,0001$) e durante o TLPP 2,73 ± 0,75 cm ($P < 0,0001$). Na mensuração de 11 minutos, o valor do LTC foi de 3,48 ± 0,50 cm, sendo ainda superior aos valores na o mesmo intervalo de tempo na condição controle 2,63 ± 0,70 cm ($P = 0,0001$) e TLPP 2,65 ± 0,71 cm ($P = 0,0002$). Aos 16 minutos pós TLS, a LTC média foi de 3,08 ± 0,63 cm, sendo considerada superior ao mesmo valor observado na condição controle 2,60 ± 0,75 ($P = 0,0350$) porém sem diferença significativa entre o TLPP de 2,68 ± 0,69 ($P = 0,0742$). Por fim, 26 minutos após o TLS, a LTC de 2,89 ± 0,54 cm não apresentou diferenças entre o mesmo período observado na condição controle 2,60 ± 0,64 cm ($P = 0,1035$) e durante o TLPP 2,65 ± 0,67 cm ($P = 0,1669$). Os valores mensurados nos diferentes intervalos de tempo para o LTC podem ser observados em uma curva criada para caracterizar a sensibilidade corneana nas diferentes condições avaliadas (Figura 2.2).

Tabela 2.1 – Valores médios (em cm) do limiar de toque da córnea (LTC) mensurados nas condições de controle, condição de teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) e condição de teste lacrimal de Schirmer (TLS), estudados em coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) numa sequência cronológica.

Condições	Limiar de toque da córnea (cm) em cada sequência cronológica (min)					
	Zero	1	6	11	16	26
Controle	2,625	2,625	2,625	2,625	2,600	2,600
TLPP	2,775	2,950	2,725	2,650	2,675	2,650
TLS	2,725	3,675	3,600	3,475	3,075	2,895

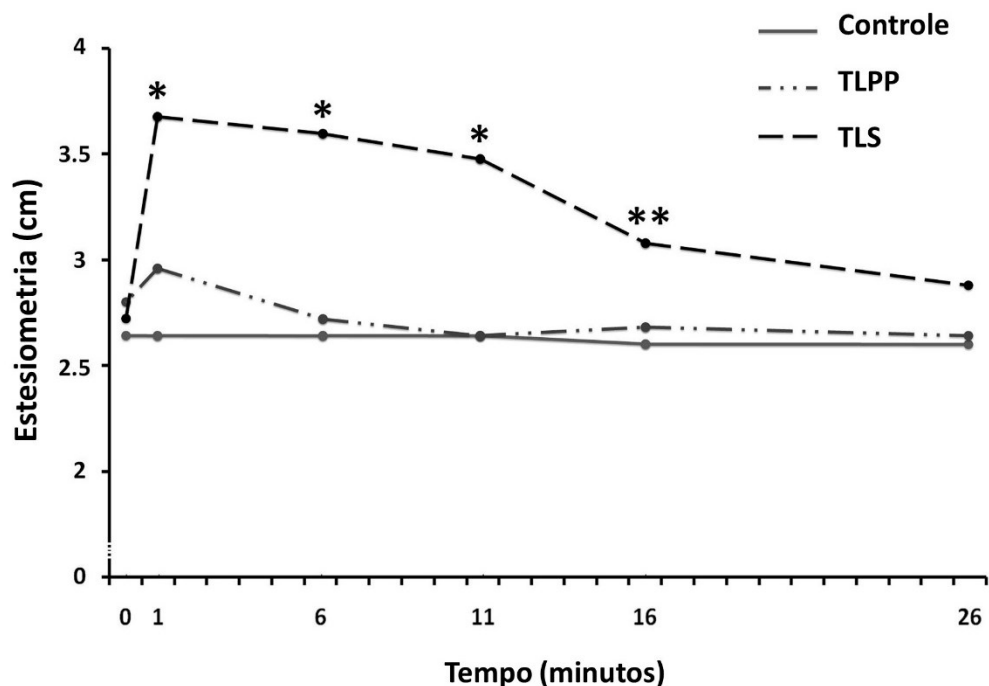


Figura 2.3 – Curva do limiar de toque da córnea (LTC) médio mensurado pela Estesiometria (cm) nos diferentes intervalos de tempo (min.) em 10 coelhos saudáveis da raça Nova Zelândia, nas condições de Controle, condição de teste lacrimal da ponta de papel (TLPP) e condição de teste lacrimal de Schirmer (TLS). Quanto maior o LTC maior a sensibilidade corneana ao toque. *Indica diferença significativa entre o TLS e ambos TLPP e condição controle. **Indica diferença significativa entre TLS e a condição controle apenas.

2.4 DISCUSSÃO

Os testes utilizados para avaliação quantitativa da lágrima foram exaustivamente estudados durante as últimas décadas, tanto na medicina quanto na medicina veterinária. Existe uma ampla literatura referente a estudos que relacionaram os testes lacrimais à redução da sensibilidade da córnea e à ceratoconjuntivite seca.²⁴⁻²⁷ Até o momento, nenhuma pesquisa anterior avaliou o desconforto ocular promovido pelos testes lacrimais, após a sua realização, portanto não existe na literatura uma curva de sensibilidade descrita após a utilização de um teste lacrimal.

Em um estudo recente que correlacionou a sensibilidade da córnea com a quantidade de lacrimação reflexa em oito tipos diferentes de espécies animais, incluindo o coelho, o coeficiente de correlação de Pearson evidenciou uma correlação pequena, porém significativa. Todavia, os autores consideraram este

baixo valor como não importante. Ainda neste estudo, os autores criaram uma modificação diferente do TLS, adaptando o comprimento do teste para cada uma das espécies em estudo, de acordo com o comprimento da pálpebra de cada animal. Nos coelhos do estudo, foi observado uma redução significativa da sensibilidade da córnea associada ao declínio da produção lacrimal de 38,4% entre os animais testados pelos métodos de TLS-I e TLS-II.²⁸

Acreditamos que as variações da sensibilidade e do desconforto corneano promovido durante o teste podem ser importantes fatores durante sucessivas avaliações do TLS. A realização do TLS é relativamente simples, porém, por vezes, durante o TLS, o animal pode se mexer deslocando a tira de papel do teste da posição adequada antes do término de 1 minuto. Desta forma, um novo TLS deveria ser repetido para avaliação. Considerando que o TLS pode estimular o reflexo de lacrimação, a realização de um teste sequencial após um teste não bem sucedido poderia resultar em um aumento induzido da produção lacrimal, promovendo valores de TLS erroneamente maiores.

Durante a realização dos testes lacrimais nos animais deste estudo, os coelhos aparentemente toleraram muito bem ambos os testes (TLS e TLPP). Porém, durante o TLS, alguns coelhos demonstraram um desconforto relativo, tornando-se mais relutantes ao teste, evidenciando sinais como blefaroespasma ou ainda tentando retirar a tira de papel do olho. Estes sinais e reações não foram observados nos mesmos animais testados pelo TLPP em nenhum dos intervalos de tempo. Isto poderia justificar o fato do TLPP não apresentar diferença na avaliação do LTC em relação à condição controle e do TLS resultar um aumento do LTC quando comparado ao TLPP e à condição controle. Considerando estes fatos, foi possível concluir que o TLPP não promover um desconforto corneano importante durante o exame dos coelhos e aparenta ser melhor tolerado pelos animais que o TLS.

O teste lacrimal de Schirmer (TLS) aumentou a sensibilidade da córnea (LTC) por pelo menos 16 minutos após o teste. Desta maneira, quando um TLS for realizado em coelhos, o LTC não deve ser mensurado até que o período de 16 minutos se encerre, pois pode interferir no valor real da sensibilidade estudada. Mas, por outro lado, se o TLPP for realizado ao invés do TLS, não há uma interferência deste teste no LTC, podendo, portanto ser mensurada a sensibilidade da córnea imediatamente após o TLPP.

Uma limitação do nosso estudo foi que há uma lacuna do valor do LTC entre o intervalo de tempo de 16 a 26 minutos para o TLS, portanto o momento exato em que a sensibilidade da córnea retornou ao normal não pôde ser precisamente determinado. Isto poderá ser mais bem explorado em uma pesquisa futura.

A sensibilidade da córnea aumenta de acordo com a intensidade do estímulo.²⁹ Tanto o TLPP quanto TLS produziram um reflexo de lacrimação durante o teste, pois a presença das tiras de papel que cada teste foi suficiente para estimular a sensibilidade da conjuntiva e da córnea; porém, o TLPP resultou em um estímulo menor que o TLS.

O limiar de toque da córnea (LTC) não foi mensurado durante a realização dos testes lacrimais. Nesta pesquisa realizou a mensuração do LTC após a resposta do estímulo (1 minuto) e nos intervalos consecutivos citados anteriormente, sendo possível concluir que o LTC após o TLPP apresentou uma pequena variação sem importância estatística, ao passo que o TLS evidenciou um aumento significativo.

O estudo do TLPP e do TLS foi realizado em um grupo homogêneo de coelhos, pois esta espécie de animal é frequentemente utilizada como modelo experimental para avaliação da sensibilidade corneana em outros estudos³⁰⁻³² sendo historicamente utilizada em uma série de estudos oftalmológicos. Ainda sim, o uso de animais de laboratório em um grupo homogêneo e em condições controladas poderia oferecer melhores condições de controle das variáveis de confusão. Por fim, coelhos seriam animais que permitiriam determinar se o TLPP poderia ser utilizado em animais que possuem olhos maiores que as demais espécies em que o teste fora anteriormente utilizado.^{10,11}

O TLPP foi facilmente realizado nos coelhos deste estudo pois o material da ponta de papel endodôntica é mais rígido e consistente que a tira de papel do TLS, o que facilita muito na inserção do TLPP no fórnice da pálpebra inferior. Este método foi desenvolvido anteriormente para uso em espécies animais que possuem olhos muito pequenos e ou que apresentem um comprimento da fissura pálpebra pequeno.¹⁰ Desta forma, conclui-se que o TLPP possa ser utilizado em animais que apresentem olhos maiores de forma satisfatória.

Os valores do TLS ($5,2 \pm 1,0$ mm/min) observados neste estudo foram semelhantes a outros descritos anteriormente em coelhos ($5,3 \pm 2,96$ mm/min).²¹

Nosso estudo estabeleceu pela primeira vez o valor de referência do TLPP em coelhos da raça Nova Zelândia. Os valores observados para o TLPP ($13,8 \pm 1,5$ mm/min) foram superiores que o TLS ($5,2 \pm 1,0$ mm/min). Acredita-se que o maior valor observado no TLPP possa permitir a detecção de uma pequena variação da produção lacrimal mais facilmente que no TLS.

Considerando a facilidade de uso do TLPP, a sua precisão e o baixo custo, acredita-se que este teste possa ser utilizado em coelhos, assim como possivelmente em outras espécies animais, como uma opção para a mensuração da produção lacrimal com mínimo desconforto ocular ou alteração do LTC.

2.5 REFERÊNCIAS

1. Harker DB. A modified Schirmer tear test technique its uses in aiding the diagnosis of chronic keratoconjunctivitis sicca (*filamentary keratitis*) in dogs. *The Veterinary Record* 1970; **86**: 196-199.
2. Gipson IK, Hori Y, Argueso P. Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease. *The Ocular Surface* 2004; **2**: 131-148.
3. Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eyes; uses and limitations. *Experimental Eye Research* 2004; **79**: 613-621.
4. Hirsh SG, Kaswan R. A comparative study of Schirmer Tear Test strips in dogs. *Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1995; **5**: 215-217.
5. Lima L, Montiani-Ferreira F, Tramontin MH et al. The chinchilla eye: morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary Ophthalmology* 2010; **13**: 14–25.
6. Silva EG, Sandmeyer LS, Gionfriddo JR et al. Tear production in canine neonates - evaluation using a modified Schirmer tear test. *Veterinary Ophthalmology* 2012; **16**: 1-5.
7. Brown MH, Galland JC, Davidson HJ et al. The phenol red thread tear test in dogs. *Veterinary Comparative Ophthalmology* 1996; **6**: 274-277.
8. Trost K, Skalicky M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Veterinary Ophthalmology* 2001; **10**: 143-213.
9. Holdt E, Rosenthal K, Shofer FS. The phenol red thread tear test in large Psittaciformes. *Veterinary Ophthalmology* 2006; **9**: 109-113.
10. Lange RR, Lima L, Montiani-Ferreira F. Measurement of tear production in black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) using three different methods: modified Schirmer's I, phenol red thread and standardized endodontic absorbent paper points. *Veterinary Ophthalmology* 2012; **15**: 376-382.
11. Lange RR, Lima L, Przydzimirski AC et al. Reference values for the production of the aqueous fraction of the tear film measured by the standardized endodontic absorbent paper point test in different exotic and laboratory animal species. *Veterinary Ophthalmology* 2013; **17**: 41 –45.
12. Strubbe DT, Gelatt KK. Chapter 11 - Ophthalmologic examination and diagnostic procedures. 427–466. In: *Veterinary Ophthalmology*. 3rd edn. (ed. Gelatt KK) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1999; 1544.
13. Hamor RE, Roberts SM, Severin GA et al. Evaluation of results for Schirmer tear tests conducted with and without application of a topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds. *American Journal of Veterinary Research* 2000; **61**: 1422-1425.

14. Margadant DL, Kirkby K, Andrew SE et al. Effect of topical tropicamide on tear production as measured by Schirmer's tear test in normal dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology* 2003; **6**: 315–320.
15. Piccione G, Giannetto C, Fazio F et al. Daily rhythm of tear production in normal horse. *Veterinary Ophthalmology* 2008; **1**: 57-60.
16. Montiani-Ferreira F, Mattos BC, Russ HH. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Ophthalmology* 2006; **9**: 209-213.
17. Montiani-Ferreira F, Truppel J, Tramontin MH et al. The capybara eye: clinical tests, anatomic and biometric features. *Veterinary Ophthalmology* 2008; **11**: 386-394.
18. Jaax GP, Graham RR, Rozmiarek H. The Schirmer tear test in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Laboratory Animal Science* 1984; **34**: 293-294.
19. Montiani-Ferreira F, Shaw G, Mattos BC et al. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *Veterinary Ophthalmology* 2008; **11**: 197-201.
20. Trbolova A, Ghaffari MS. Reference values for Schirmer tear tests I and II in clinically normal pigs. *Veterinary Ophthalmology* 2012; **15**: 180-182.
21. Abrams KL, Brooks DE, Funk RS et al. Evaluation of the Schirmer tear test in clinically normal rabbits. *American Journal of Veterinary Research*. 1990; 51: 1912–1913.
22. Brown MH, Galland JC, Davidson HJ et al. The phenol red thread tear test in dogs. *Veterinary Comparative Ophthalmology* 1996; **6**: 274-277.
23. Pumarola-Suné J, Sola-Vicens L, Sentis-Vilalta J et al. Absorbancy properties of different brands of standardized endodontic paper points. *Journal of Endodontics* 1998; **24**: 12.
24. Gelatt KN, Peiffer RL, Erickson JL et al. Evaluation of tear formation in the dog, using a modification of the Schirmer tear test. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1975; **166**: 368-370.
25. Brooks DE, Clark CK, Lester GD. Cochet-Bonnet aesthesiometer-determined corneal sensitivity in neonatal foals and adult horses, *Veterinary Ophthalmology* 2000; **3**: 133-137.
26. Benitez-del-Castillo JMMD, del Rio TMD, Iradier TMD et al. Decrease in Tear Secretion and Corneal Sensitivity After Laser In Situ Keratomileusis. *The Journal of Cornea and External Disease* 2001; **20**: 30-32.
27. Coassin M, Lambiase A, Costa N et al. Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2005; **243**: 151-155.

28. Wieser B, Tichy A, Nell B. Correlation between corneal sensitivity and quantity of reflex tearing in cows, horses, goats, sheep, dogs, cats, rabbits, and guinea pigs. *Veterinary Ophthalmology* 2013; **4**: 251–262.
29. Acosta CM, Belmonte C, Gallar J. Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *Journal of Physiology* 2001; **2**: 511–525.
30. Chen W, Zhang Z, Hu J et al. Changes in Rabbit Corneal Innervation Induced by the Topical Application of Benzalkonium Chloride. *Cornea* 2013; **9**: 1599–1606.
31. Cortina MS, He J, Li N et al. Recovery of corneal sensitivity, calcitonin gene-related peptide-positive nerves, and increased wound healing induced by pigment epithelial-derived factor plus docosahexaenoic acid after experimental surgery. *Archives of Ophthalmology* 2012; **130**: 76–83. 32.
32. Linda J, Müller LJ, Marfurt CF et al. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research* 2003; **76**: 521– 542.

3. CAPÍTULO – 3

COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DA CONJUNTIVA DE COELHOS INDUZIDAS PELO USO TÓPICO DE ANÁLOGOS DE PROSTAGLANDINA COM E SEM CONSERVANTES.

RESUMO

Objetivos: Avaliar e comparar alterações induzidas na conjuntiva de coelhos tratados topicamente com análogos de prostaglandina (APG) contendo cloreto de benzalcônio (BAK), amônia poliquaternária (PQ) e sem conservantes (BAKFREE), avaliando testes clínicos, histomorfométricos e imuno-histoquímicos.

Material e métodos: Um total de 60 coelhos (120 olhos) foram divididos em seis grupos, tratados diariamente durante 30 dias com: latanoprost^{BAK}, bimatoprost^{BAK}, travoprost^{BAK}, travoprost^{PQ}, tafluprost^{BAKFREE} e solução controle^{BAK}. Apenas o olho esquerdo foi tratado, sendo o direito usado como controle. Avaliou-se o teste lacrimal de Schirmer (TLS), sensibilidade da córnea (SC) e a pressão intra-ocular (PIO) antes e após o tratamento. Foi mensurada pela histomorfometria da conjuntiva o número de células caliciformes do epitélio e a espessura da parede vascular (EPV) do estroma subjacente. Avaliou-se ainda marcadores imuno-histoquímicos de inflamação como macrófagos reativos (RAM11), endotélio vascular reativo (VCAM-1) e linfócitos reativos (CD45RO).

Resultados: Não foram observadas alterações na SC e TLS. A PIO reduziu em todos os olhos tratados com APG, não variando no tratamento com a solução controle^{BAK}. O número de células caliciformes aumentou após o tratamento em todos os APG, exceto na solução controle^{BAK}. A EPV aumentou após o tratamento com travoprost^{BAK}, bimatoprost^{BAK}, e latanoprost^{BAK}. O aumento da resposta macrofágica foi observado em todos os grupos que possuíam BAK como conservante. A inflamação do endotélio vascular foi detectada apenas após o tratamento com travoprost^{BAK}. O aumento de linfócitos reativos foi observado após o tratamento com travoprost^{BAK}, bimatoprost^{BAK}, latanoprost^{BAK} e tafluprost^{BAKFREE}.

Discussão: Os APG parece exercer um efeito protetor sobre as células caliciformes durante o curto período de tratamento que contenha BAK na formulação. As drogas APG associadas ao BAK e o uso isolado do BAK pode induzir alterações na conjuntiva de coelhos, resultando em aumento da resposta inflamatória vascular e estimulação celular de macrófagos e linfócitos reativos, porém sem alteração importante para a SC e TLS durante 30 dias de tratamento.

Palavras-chave: Tratamento do glaucoma; inflamação da conjuntiva, cloreto de benzalcônio, histomorfometria, imuno-histoquímica.

3.1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*) o glaucoma é a primeira enfermidade mais importante responsável pelo desenvolvimento de cegueira na população mundial.¹ Frequentemente a primeira opção de terapia para os pessoas com glaucoma constitui de um tratamento clínico com o uso de drogas antiglaucomatosas. O uso destas drogas via tópica ocular pode ser necessário muitos anos, e muitas vezes durante toda a vida do paciente, sendo comum o desenvolvimento de alterações da superfície ocular e inflamação da conjuntiva durante este período.²⁻⁴

A superfície ocular reage de forma específica a uma grande variedade de agressores externos, tais como poluição do ar, alterações climáticas, contaminação com agentes infecciosos, alérgenos e ao tratamento tópico com drogas oftálmicas.^{4,5-7}

Os efeitos adversos observados na conjuntiva após o uso de drogas oftálmicas (colírios) pode ser uma consequência da ação da própria droga sobre a conjuntiva, decorrente da presença de determinados tipos de conservantes nas formulações, ou ainda, da ação conjunta de ambos. O conservante mais utilizado nas formulações oftálmicas é o cloreto de benzalcônio – *benzalkonium chloride* (BAK), que apresenta uma ação antimicrobiana pelo seu efetivo poder detergente sobre a parede celular da membrana bacteriana.⁸ Os efeitos tóxicos deste conservante estão bem relatados na literatura médica oftálmica e compreende uma grande variedade de mecanismos diretos e indiretos, que envolvem o sistema imune local, o epitélio corneano e conjuntival, o filme lacrimal, podendo interferir na sensibilidade neurológica da córnea e conjuntiva.⁹⁻

11

O efeito detergente do BAK pode resultar em diminuição da quantidade de células caliciformes da conjuntiva, sendo descrito como um dos responsáveis pela indução à alteração da estabilidade do filme lacrimal, que por sua vez contribui para intensificar a inflamação ocular, aumento a liberação de linfócitos reativos, macrófagos reativos e células de Langerhans durante a terapia crônica.^{12,13}

Entre as principais classes de drogas utilizadas atualmente para o tratamento clínico do glaucoma encontram-se os agentes colinérgicos, beta

bloqueadores, agonistas alfa adrenérgicos, inibidores da anidrase carbônica, análogos de prostaglandina (APG) e combinações fixas destas drogas associadas ao maleato de timolol,¹⁴⁻¹⁶ sendo a maioria delas associada ao conservante BAK. Na tentativa de reduzir os efeitos adversos do BAK, foram desenvolvidos estudos com o uso de drogas antiglaucomatosas associadas a outros tipos de conservante ou sem adição de conservante (*bakfree*). Alguns destes estudos relataram uma redução da prevalência de sinais clínicos de desconforto ocular em pessoas que fizeram o uso de drogas *bakfree* por períodos prolongados de tratamento.¹⁷⁻¹⁹

A presença do BAK nas formulações oftálmicas esteve relacionada ao desenvolvimento de alterações da superfície ocular, que a longo prazo pode resultar em inflamação da conjuntiva, acometendo a função fisiológica normal celular e imunológica local.¹⁹⁻²² Alguns destes efeitos adversos foram anteriormente estudados em ensaios clínicos com pessoas sob terapia antiglaucomatosa, avaliando-se alterações em determinados testes oftálmicos; outros utilizando cultivo celular, e outros com uso de animais como modelo experimental. Até agora, não há um estudo controlado que tenha sido realizado em coelhos, avaliando o efeito do uso de APG com e sem conservante, mensurando na mesma pesquisa as alterações da morfologia celular da conjuntiva, detecção imuno-histoquímica de marcadores de inflamação e avaliação de modificações de testes oftálmicos específicos.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar e comparar o efeito do uso de diferentes APG comercializados para terapia do glaucoma em pessoas, associados e não ao conservante, sobre a conjuntiva de coelhos saudáveis, para detecção de alterações em determinados testes oftálmicos, modificações histomorfométricas e detecção imuno-histoquímica de mediadores inflamatórios da conjuntiva, após o tratamento tópico contínuo durante 30 dias.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos que envolveram a utilização de animais vivos foram conduzidos de acordo com as “Normas para uso de animais em Pesquisas Oftalmológicas” da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*) e de acordo com as exigências aprovadas pela Comitê de Ética no uso de animais no Setor de Ciências Agrárias CEUA-SCA da Universidade Federal do Paraná.

Foram selecionados aleatoriamente sessenta coelhos brancos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) de um criador comercial local. Todos os animais (25 machos e 35 fêmeas) apresentaram peso médio aproximado (2,5 Kg) e idade média de cinco meses.

Os coelhos foram transportados em gaiolas apropriadas para o Vivário de Oftalmologia Experimental da Universidade Federal do Paraná (criado e desenvolvido especialmente para esta pesquisa) onde cada grupo permaneceu durante 40 dias. Antes de se iniciar o tratamento, os animais foram desverminados e reavaliados clínica e oftalmologicamente, realizando-se um exame físico completo dos indivíduos.

Durante a fase de adaptação ao ambiente experimental, os coelhos permaneceram sob adaptação por 10 dias sem tratamento, acomodados em gaiolas com água filtrada e comida à vontade (ração comercial de coelho e feno de alfafa e/ou verduras frescas). No oitavo dia de adaptação, em um momento anterior ao início do tratamento, foram realizados testes oftálmicos específicos para determinar parâmetros de interesse do estudo. Ao término do décimo dia de adaptação, deu-se início ao tratamento propriamente dito, que fora mantido durante 30 dias consecutivos, de acordo com a droga de cada grupo experimental.

Os parâmetros clínicos oftálmicos mensurados antes do tratamento foram novamente mensurados ao término do tratamento, mantendo-se o mesmo horário de avaliação realizado no momento inicial.

As drogas utilizadas nesta pesquisa foram selecionadas de acordo com as apresentações farmacológicas comerciais (colírios) de análogos de prostaglandina (APG) associados com o conservante cloreto de benzalcônio

(BAK), ou com amônia poliquaternária-1 (PQ) ou ainda sem associação de conservantes, ditos como livres de conservante (*bakfree*).

Os animais foram divididos em seis grupos contendo 10 animais cada, sendo tratados com latanoprost 0,05%^{BAK} 0,02% (Xalatan® Pfizer Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil), bimatoprost 0,03%^{BAK} 0,005% (Lumigan® Allergan Indústria Farmacêutica Ltda., Guarulhos, SP, Brasil), travoprost 0,004%^{BAK} 0,015% (Travatan® Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), travoprost 0,004%^{PQ} 0,001% (Travatan® Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), tafluprost^{BAKFREE} (Saflutan® MSD - Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) e uma solução controle^{BAK} 0,01% (solução salina associada ao cloreto de benzalcônio 0,01%, Ophthalmos Farmácia Oftalmológica de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil). Todos os grupos foram tratados apenas no olho esquerdo, instilando-se uma gota da droga diariamente, em horários fixos às 8 horas da manhã. O olho direito serviu como controle para o tratamento, não recebendo medicação. Todas as drogas utilizadas podem ser visualizadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Drogas oftálmicas utilizadas para o tratamento do olho esquerdo de coelhos brancos da raça Nova Zelândia, de acordo com o respectivo número de animais (N) e o nome comercial do produto.

Drogas	N	Nome comercial
Latanoprost ^{BAK} 0,02%	10	Xalatan ¹
Bimatoprost ^{BAK} 0,005%	10	Lumigan ²
Travoprost ^{BAK} 0,015%	10	Travatan* ³
Travoprost ^{PQ} 0,001%	10	Travatan* ⁴
Tafluprost ^{BAKFREE}	10	Saflutan ⁵
Solução controle ^{BAK} 0,01%	10	BAK** ⁶

*Não há diferenças entre o nome comercial do Travatan® associado ao conservante cloreto de benzalcônio (BAK) e ao Travatan® associado ao conservante de amônia poliquaternária (PQ)

**BAK = cloreto de benzalcônio

1 - Xalatan® (Pfizer Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil)

2 - Lumigan® (Allergan Indústria Farmacêutica Ltda., Guarulhos, SP, Brasil)

3 - Travatan® (Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil)

4 - Travatan® (Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil)

5 - Saflutan® (MSD - Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP, Brasil)

6 – Cloreto de Benzalcônio (Ophthalmos Farmácia Oftalmológica de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil).

Testes oftálmicos

Foram avaliados um total de 120 olhos de 60 coelhos saudáveis. As estruturas oculares do segmento anterior foram avaliadas por meio do uso de uma fonte de luz de um transiluminador tipo *Finoff* (Welch Allyn, Skaneateles Falls, NY, USA) e um biomicroscópio com lâmpada de fenda (Hawk Eye; Dioptrix, L'Union, France). Os testes oftálmicos foram realizados por um único avaliador (LL), para evitar diferenças de interpretação interobservador. Os coelhos foram avaliados individualmente, contidos com auxílio de toalhas enrolada ao redor do corpo, tomando-se o cuidado para manter o animal sem desconforto.

Quando a cabeça do animal era manualmente estabilizada, havia-se um cuidado para não se realizar compressão sobre a região do pescoço, na tentativa de prevenir mensurações errôneas da pressão intraocular (PIO). A sequência de realização dos testes oftálmicos foi pré-determinada em: (1) Inspeção ocular; (2) mensuração da sensibilidade da córnea por meio da estesiometria; (3) teste lacrimal de Schirmer (TLS) e (4) mensuração da PIO por tonometria. Os parâmetros de umidade e temperatura foram monitorados durante todos os testes, apresentando umidade que variou entre 70 a 73% e temperatura oscilando entre 20 a 23,5°C.

Sensibilidade da córnea (SC)

A avaliação da sensibilidade central da córnea foi realizada em ambos os olhos em todos os coelhos por meio da utilização de um estesiômetro de Cochet-Bonnet (*Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, França*). Este instrumento possui um monofilamento de náilon com espessura pré-definida (0,12 mm), o qual é aplicado perpendicularmente sobre a superfície central da córnea, variando-se o teste entre diferentes comprimentos de fio. A mensuração foi obtida por meio da observação do estímulo produzido pelo toque do filamento sobre a córnea, o qual é necessário para desencadear o reflexo de piscar.

Neste estudo, somente a região central da córnea foi avaliada pelo toque, realizando-se uma mensuração repetida por três vezes em um mesmo comprimento de fio. Caso o animal não apresentasse o estímulo, o valor do comprimento do filamento era reduzido em 0,5 cm, repedindo-se as mensurações, até que cada coelho viesse a responder com o reflexo do fechamento palpebral.

A avaliação do teste permite comparar o comprimento de fio necessário para causar a resposta ao estímulo (mensurado em centímetros), com a sensibilidade da área central corneana.

Teste lacrimal de Schirmer (TLS)

Para mensuração do teste lacrimal de Schirmer (TLS) tipo 1, o qual mensura a produção basal e parte da produção reflexa da fração aquosa do filme lacrimal, foram utilizadas tiras de papel estéril de TLS padronizado (Ophthalmos - Farmácia Oftalmológica de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil) em ambos os olhos de todos animais. A fração aquosa da lágrima foi mensurada em milímetros durante sessenta segundos.

Pressão intraocular (PIO)

A pressão intraocular (PIO) foi mensurada em todos os olhos, utilizando-se um tonômetro de rebote digital (Tonovet®, Lumic International, Baltimore, MD, USA). Não foi utilizado colírio anestésico para a mensuração da PIO e o sistema de avaliação do tonômetro foi calibrado para o modo personalizado para espécies de animais indefinidos. Este tipo de tonômetro usa uma probe eletromagnética que fornece um valor médio calculado entre 6 mensurações consecutivas, utilizando-se a região corneana central para estimativa da PIO média.^{23,24}

Eutanásia e coleta de amostras

Após o tratamento ininterrupto durante 30 dias, os animais foram eutanasiados de acordo com as normas do Código de Ética do Médico Veterinário, por meio de injeção intravesona em bolus de anestésico pentobarbital (200 mg/Kg). Após o óbito, foram coletados os olhos inteiros e o tecido periocular (pálpebras), sendo imediatamente fixadas em solução de formol a 10% tamponada, na proporção de volume 1:10, permanecendo em imersão durante 24 horas para fixação.

Análise histomorfométrica e imuno-histoquímica

Após a fixação, os olhos foram seccionados em seu eixo longitudinal sendo submetido ao processamento histotécnico padrão (Faria, 2013). Os cortes do bloco parafinado foram realizados com espessura de 5 µm, sendo montados em lâminas de vidro (Starfrost adhesive slide, Waldemar Knittel GmbH, Hamburg, Alemanha) sendo corados com corante de HE (Hematoxilina-Eosina) e PAS (ácido periódico de Schiff).

A análise histomorfométrica quantitativa da conjuntiva foi realizada para avaliar a presença de infiltrado inflamatório, contagem do número de células calciformes e mensuração da espessura da parede vascular (EPV). A avaliação qualitativa óptica foi realizada em seguimentos lineares de conjuntiva de 200 µm. Para a análise morfométrica quantitativa utilizou o software *Image Pro-Plus* versão 4 (IP4) (*Media Cybernetics, Silver Spring, MD*).

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada com captação de imagens com magnificação de 400x, utilizando o mesmo software. Cada imagem, foi virtualmente gradeada (150 X 200 Wm) realizando-se uma análise detalhada específica da região epitelial e do estroma subjacente da conjuntiva. As mensurações realizadas foram desenvolvidas por um único avaliador, para evitar divergências inter-observador.

A análise imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada com três anticorpos distintos para a detecção de: (1) macrófagos reativos, com um anticorpo monoclonal de coelho - *rabbit anti-macrophage* - RAM11 (*DakoCytomation, CA, EUA*, na diluição 1:800); (2) linfócitos-T reativos, com anticorpo anti-CD45RO (*BD Biosciences Pharmingen, EUA*, na diluição 1:800) e (3) inflamação vascular, que marca moléculas de adesão nas células do endotélio vascular reativo - *reactive vascular cellular adhesion molecule* - VCAM-1 (*Novocastra Laboratories Ltd, Inglaterra*, na diluição 1:200). Estes três marcadores foram escolhidos por apresentar alta afinidade pelos sítios de ação em situação de inflamação crônica que curse com reação de macrófagos, linfócitos e alterações no endotélio vascular em coelhos.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (DP). Os testes oftálmicos foram analisados em cada droga utilizada, comparando-se os

resultados obtidos antes e após o tratamento (média \pm DP) dos olhos esquerdo (tratados) e dos olhos direito (controle) usando um teste-*t* com significância de 5%. A análise histomorfométrica e os valores de IHQ foram comparados apenas no período pós-tratamento. Para isso foi realizado teste *One-way* ANOVA, com nível de significância de 5%, para comparar as variáveis contínuas numéricas. Caso fosse detectado significância estatística, os dados foram submetidos ao pós-teste de Tukey-Kramer (Statview V; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $P < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

Testes Oftálmicos

Sensibilidade da córnea

A comparação da sensibilidade da córnea (SC) avaliada antes e após o tratamento não apresentou alteração significativa para nenhuma das drogas testadas ($P > 0,05$). Todos os valores da SC (média \pm DP) com os respectivos valores de P podem ser visualizados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores da sensibilidade da córnea (SC) observados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP.

Drogas	SC antes do tratamento (cm)	SC após o tratamento (cm)	Valor de P
Latanoprost ^{BAK 0,02%}	2,2 \pm 0,3	2,0 \pm 0,4	0,2317
Bimatoprost ^{BAK 0,005%}	2,3 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	0,1194
Travoprost ^{BAK 0,015%}	2,6 \pm 0,4	2,6 \pm 0,3	0,6764
Travoprost ^{PQ}	2,0 \pm 0,5	2,3 \pm 0,3	0,1589
Tafluprost ^{BAKFREE}	2,4 \pm 0,4	2,5 \pm 0,4	0,7947
Solução controle ^{BAK}	2,5 \pm 0,5	2,3 \pm 0,6	0,7924

*Os valores de P superiores à 0,05 não foram considerados significantes.

Teste lacrimal de Schirmer

A comparação da mensuração aquosa da lágrima pelo teste lacrimal de Schirmer (TLS) tipo 1, antes e após o tratamento não demonstrou alteração significativa em nenhum dos grupos avaliados ($P > 0,05$). Os valores para o TLS

(média \pm DP) com os respectivos valores de P podem ser visualizados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Valores do teste lacrimal de Schirmer (TLS) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP em milímetros, durante o intervalo de 1 minuto.

Drogas	TLS antes do tratamento (mm)	TLS após o tratamento (mm)	Valor de P
Latanoprost ^{BAK} 0,02%	6,8 \pm 0,7	4,8 \pm 0,9	0,6182
Bimatoprost ^{BAK} 0,005%	6,8 \pm 2,0	6,0 \pm 2,1	0,3942
Travoprost ^{BAK} 0,015%	7,0 \pm 3,3	8,1 \pm 3,7	0,4916
Travoprost ^{PQ}	5,9 \pm 0,9	6,6 \pm 1,2	0,1480
Tafluprost ^{BAKFREE}	5,8 \pm 1,0	5,3 \pm 1,0	0,2993
Solução controle ^{BAK}	6,4 \pm 1,5	6,1 \pm 0,5	0,7885

*Os valores de P superiores à 0,05 não foram considerados significantes.

Pressão intra-ocular

A comparação da mensuração da pressão intraocular (PIO) antes e após o tratamento demonstrou alteração significativa em todos os grupos tratados com APG, exceto para a solução controle^{BAK}, que continha apenas o veículo com o conservante. Os valores da PIO (média \pm DP) com os respectivos valores de P podem ser visualizados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Valores da pressão intra-ocular (PIO) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP.

Drogas	PIO antes do tratamento (mmHg)	PIO após o tratamento (mmHg)	Valor de P
Latanoprost ^{BAK} 0,02%	13,3 \pm 0,7	10,8 \pm 0,8	<0,0001*
Bimatoprost ^{BAK} 0,005%	12,3 \pm 1,2	10,8 \pm 1,6	0,0285*
Travoprost ^{BAK} 0,015%	12,5 \pm 1,3	09,3 \pm 1,3	<0,0001*
Travoprost ^{PQ}	12,5 \pm 1,0	10,4 \pm 1,0	0,0001*
Tafluprost ^{BAKFREE}	12,6 \pm 1,7	10,9 \pm 1,1	0,0166*
Solução controle ^{BAK}	12,4 \pm 2,3	12,0 \pm 1,2	0,7404

*Os valores de P inferiores à 0.05 foram considerados significantes.

Análise histomorfométrica e imuno-histoquímica

Densidade das células calciformes

A comparação do número de células calciformes entre os olhos tratados (esquerdo) e controle (direito) após 30 dias de tratamento contínuos demonstraram um aumento significativo em todas as drogas testadas, exceto para a solução controle^{BAK}. A contagem da quantidade de células calciformes (média \pm DP) com os respectivos valores de *P* pode ser visualizada na Tabela 3.5.

As fotomicrografias representativas do aumento do número de células calciformes da conjuntiva dos olhos tratados e não tratados podem ser visualizadas na Figura 3.1.

Tabela 3.5 – Comparação da densidade de células calciformes (média \pm DP) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas.

Drogas	OD	OS	Valor de <i>P</i>
Latanoprost ^{BAK} 0,02%	10,3 \pm 1,567	15,4 \pm 2,757	<0,0001*
Bimatoprost ^{BAK} 0,005%	10,9 \pm 2,378	14,5 \pm 3,100	0,0093*
Travoprost ^{BAK} 0,015%	09,9 \pm 0,994	12,4 \pm 2,757	0,0147*
Travoprost ^{PQ}	10,5 \pm 1,581	13,0 \pm 2,211	0,0094*
Tafluprost ^{BAKFREE}	10,5 \pm 1,841	14,3 \pm 2,406	0,0009*
Solução controle ^{BAK}	12,8 \pm 6,017	14,8 \pm 5,848	0,6085

*Os valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados significantes.

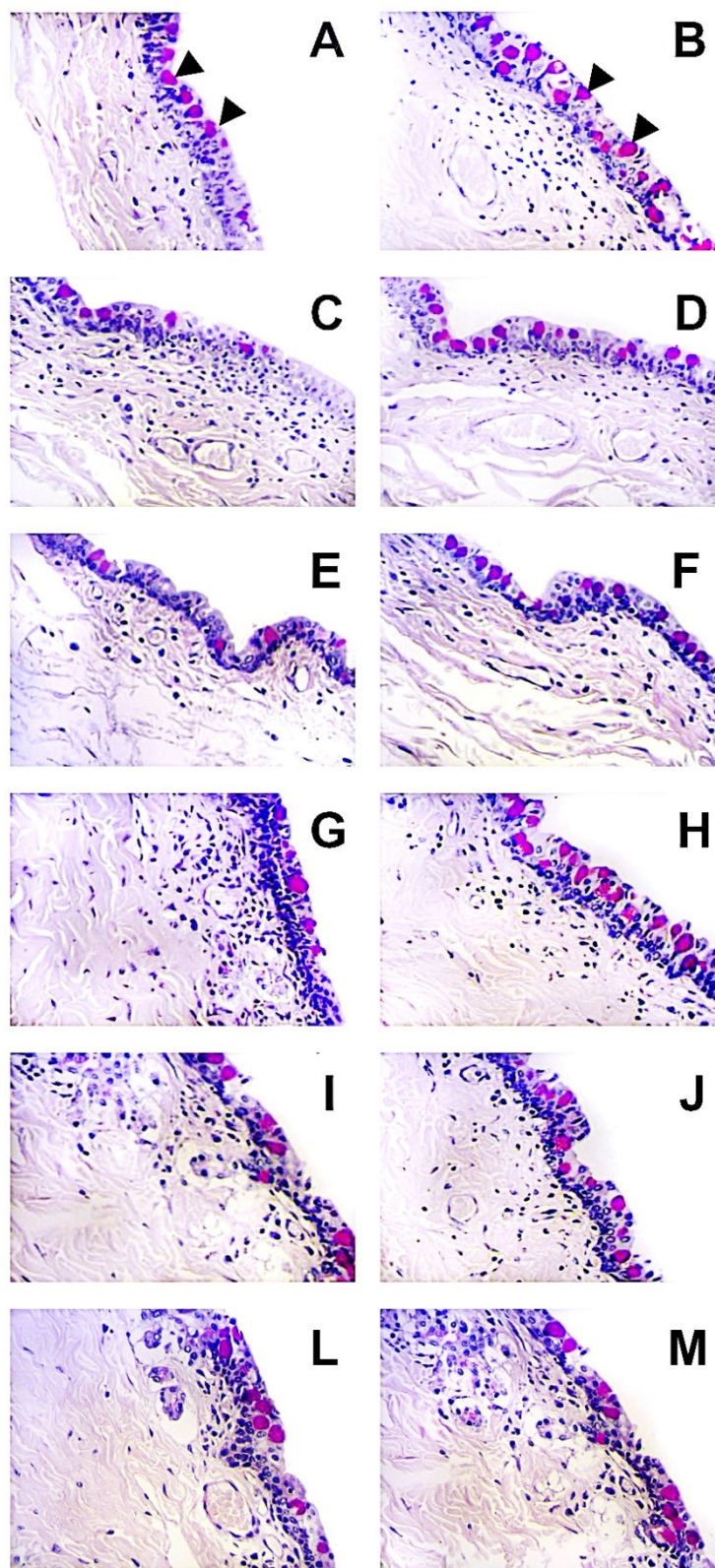


Figura 3.1 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (200x) coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). A densidade de células caliciformes (cabeça de seta preta) foram maiores nos olhos esquerdos tratados (B,D,F,H,J,M) do que nos olhos direito não-tratados (A,C,E,G,I,L). A e B se referem à droga latanoprost^{BAK}. C e D à bimatoprost^{BAK}. E e F à travoprost^{BAK}. G e H à travoprost^{PQ}. I e J à tafluprost^{BAKFREE}. L e M à solução controle^{BAK}.

Espessura da parede vascular

A espessura da parede vascular (EPV) do tecido conjuntival foi comparada entre os olhos tratados (esquerdo) e controle (direito), após 30 dias de tratamento contínuos. Os olhos tratados com latanoprost^{BAK0,02%}, bimatoprost^{BAK0,005%} e travoprost^{BAK0,015%} evidenciaram um aumento significativo da EPV. Para o restante das drogas testadas, incluindo a solução controle^{BAK}, não houve diferença significativa entre os olhos esquerdo e direitos. Os valores da EPV (média ± DP) com os respectivos valores de *P* podem ser visualizados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Comparação da espessura da parede vascular (EPV) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em µm.

Drogas	EPV do OD (µm)	EPV do OE (µm)	Valor de <i>P</i>
Latanoprost ^{BAK 0,02%}	2,831 ± 0,898	6,022 ± 1,124	<0,0001*
Bimatoprost ^{BAK 0,005%}	4,846 ± 0,932	6,364 ± 1,462	0,0126*
Travoprost ^{BAK 0,015%}	3,636 ± 0,764	5,224 ± 1,216	0,0026*
Travoprost ^{PQ}	5,264 ± 1,239	5,917 ± 1,175	0,2426
Tafluprost ^{BAKFREE}	4,793 ± 1,227	4,094 ± 1,165	0,2080
Solução controle ^{BAK}	4,774 ± 1,715	4,484 ± 1,482	0,7821

*Os valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados significantes.

A análise imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de macrófagos reativos (anti-RAM11) comparada entre os olhos esquerdo (tratados) e direito (controles), após 30 dias de tratamento demonstrou um aumento da resposta ao anticorpo RAM11 nos olhos tratados com latanoprost^{BAK0,02%}, bimatoprost^{BAK0,005%}, travoprost^{BAK0,015%} e solução controle^{BAK}. Para a travoprost^{PQ} e tafluprost^{BAKFREE}, não houve diferença significativa entre os olhos esquerdo e direitos (Tabela 3.7). A resposta IHQ anti-RAM11 pode ser melhor avaliada na Figura 3.2.

Tabela 3.7 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-RAM11 entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em somatório de áreas em μm^2 .

Drogas	RAM11 no OD (μm^2)	RAM11 no OS (μm^2)	Valor de <i>P</i>
Latanoprost ^{BAK 0,02%}	4231,953 \pm 1969,919	8453,661 \pm 3571,881	0,0042*
Bimatoprost ^{BAK 0,005%}	719,129 \pm 885,751	1822,712 \pm 923,220	0,0138*
Travoprost ^{BAK 0,015%}	153,846 \pm 103,660	661,52 \pm 290,920	<0,0001*
Travoprost ^{PQ}	1552,545 \pm 1178,785	1990,188 \pm 1308,868	0,4423
Tafloprost ^{BAKFREE}	1121,01 \pm 713,045	1622,037 \pm 974,298	0,2059
Solução controle ^{BAK}	2119,253 \pm 673,626	5936,106 \pm 1237,987	0,0003*

*Os valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados significantes.

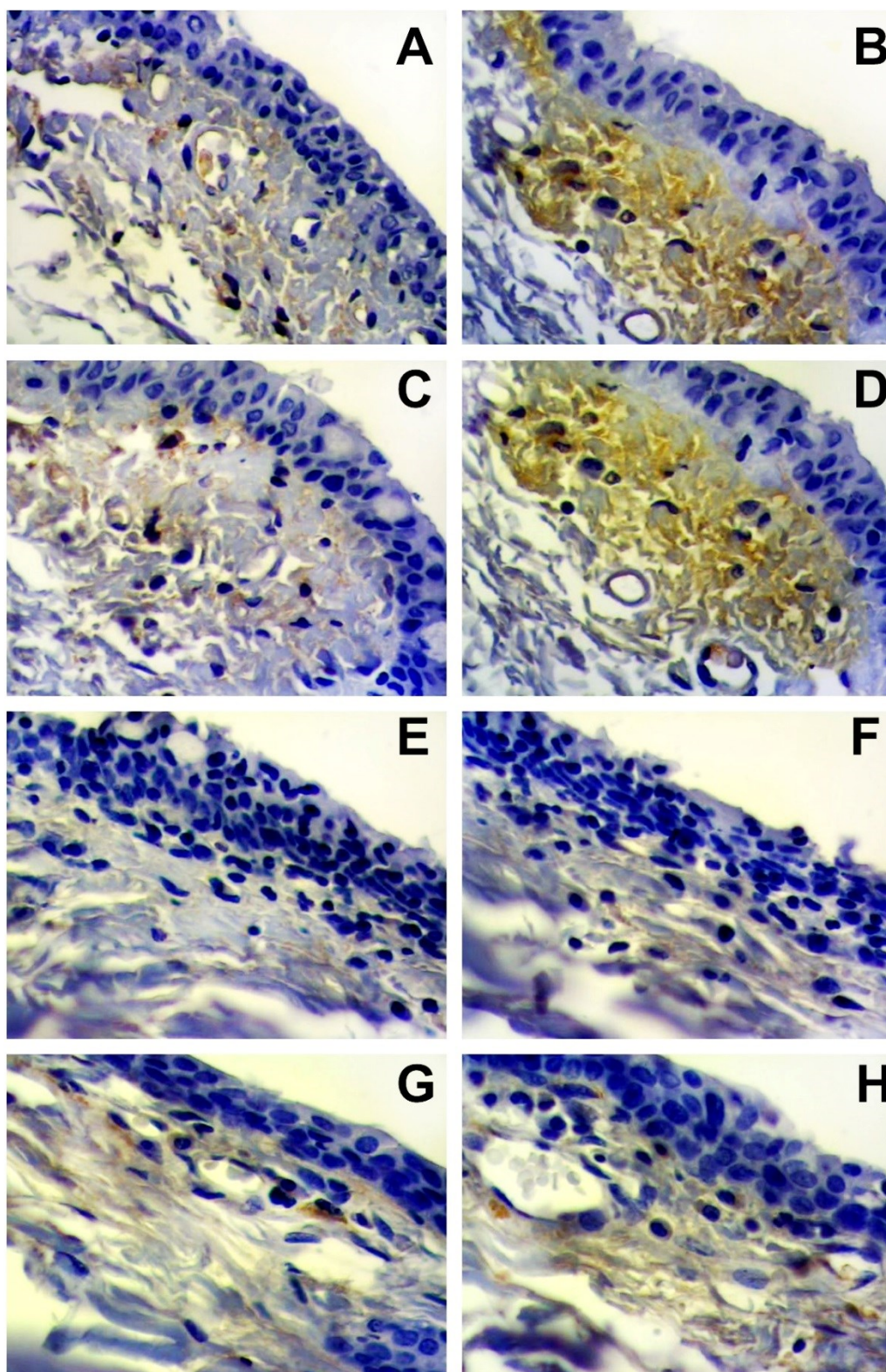


Figura 3.2 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-RAM11. A e B se referem à droga bimatoprost^{BAK}. C e D à latanoprost^{BAK}. E e F à travoprost^{PQ}. G e H à tafluprost^{BAKFREE}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foram mais intensas nos olhos esquerdos (B, D) do que nos olhos direitos (A, C), em contraste com a contracoloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença em (F,H) e (E,G).

A resposta da conjuntiva ao anticorpo anti-CD45RO, para detecção de linfócitos reativos, foi comparada entre os olhos esquerdo (tratados) e direito (controles), após 30 dias de tratamento. Os olhos tratados com latanoprostá^{BAK0,02%}, bimatoprostá^{BAK0,005%}, travoprostá^{BAK0,015%} e tafluprostá^{BAKFREE} apresentaram aumento da resposta ao anticorpo CD45RO quando comparados aos olhos controle. Não foi observada diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito tratados com travoprostá^{PQ} e solução controle^{BAK} (Tabela 3.8). A resposta anti-CD45RO pode ser melhor visualizada na Figura 3.3.

Tabela 3.8 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-CD45RO entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em somatório de áreas em μm^2 .

Drogas	CD45RO no OD (μm^2)	CD45RO no OS (μm^2)	Valor de <i>P</i>
Latanoprostá ^{BAK 0,02%}	86,284 ± 40,128	179,837 ± 3,879	0,0052*
Bimatoprostá ^{BAK 0,005%}	482,522 ± 445,691	1032,032 ± 613,233	0,0342*
Travoprostá ^{BAK 0,015%}	91,526 ± 18,080	143,158 ± 57,914	0,0149*
Travoprostá ^{PQ}	37,305 ± 21,223	52,035 ± 29,27	0,2139
Tafluprostá ^{BAKFREE}	333,925 ± 170,599	638,338 ± 226,759	0,0032*
Solução controle ^{BAK}	73,377 ± 47,682	123,892 ± 57,972	0,1708

*Os valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados significantes.

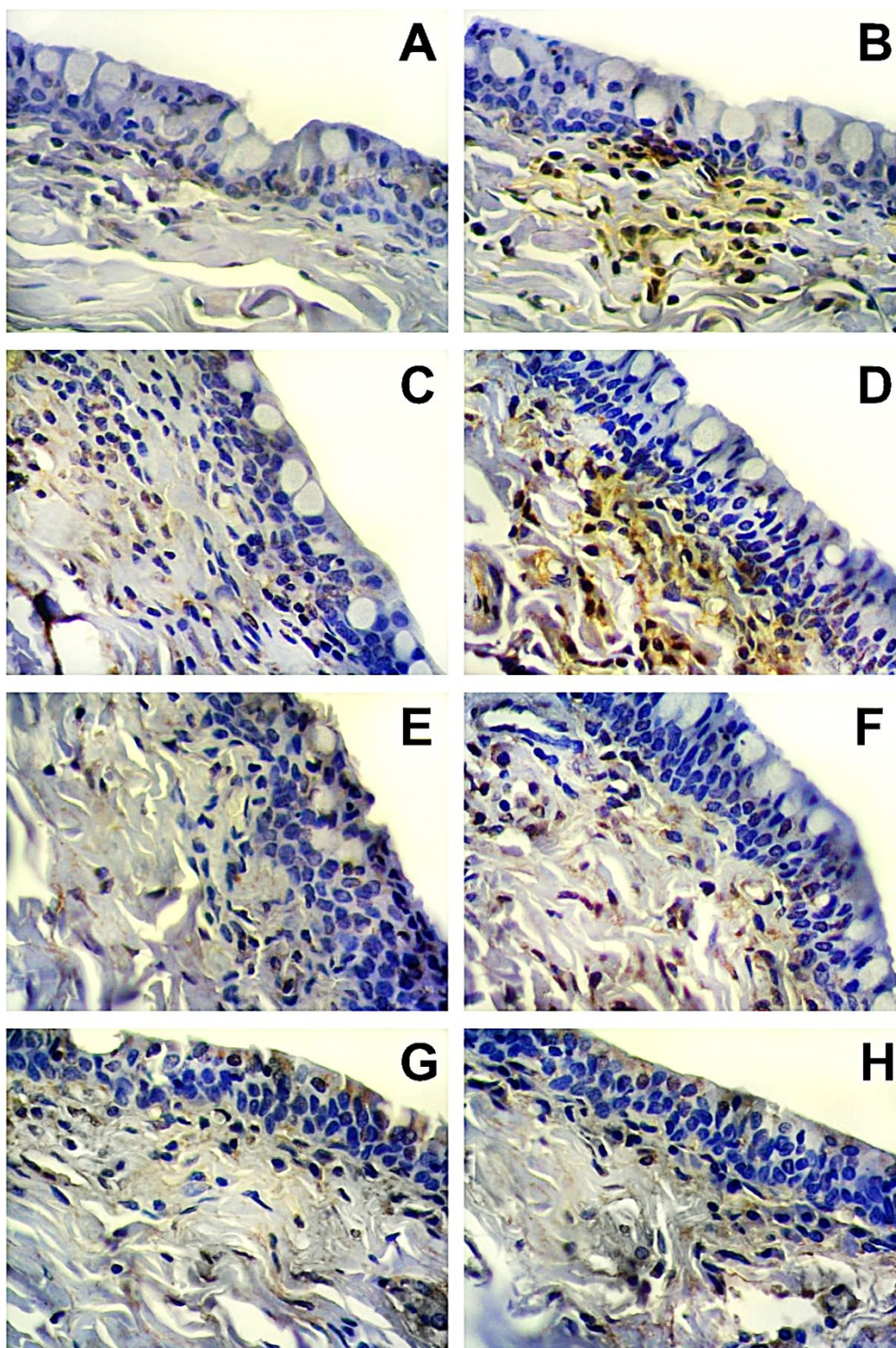


Figura 3.3 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-CD45RO. A e B se referem à droga travoprost^{BAK}. C e D à bimatoprost^{BAK0,005%}. E e F à travoprost^{PQ}. G e H à solução controle^{BAK}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foi maior nos olhos esquerdo (B, D) que nos olhos direito (A, C), em contraste com a contracoloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença entre (E e F) e (G e H).

A resposta da conjuntiva ao anticorpo anti-VCAM, para detecção de inflamação do endotélio vascular, foi comparada entre os olhos esquerdo (tratados) e direito (controles), após 30 dias de tratamento. Apenas os olhos tratados com travoprostas^{BAK0,015%} apresentaram aumento da resposta ao anticorpo quando comparados aos olhos controle. Não foi observada diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito tratados com as demais drogas (Tabela 3.9). A resposta anti-VCAM pode ser melhor visualizada na Figura 3.4.

Tabela 3.9 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-VCAM entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em somatório de áreas em μm^2 .

Drogas	VCAM no OD (μm^2)	VCAM no OS (μm^2)	Valor de <i>P</i>
Latanoprostas ^{BAK 0,02%}	181,320 \pm 160,260	257,819 \pm 176,640	0,3239
Bimatoprostas ^{BAK 0,005%}	193,595 \pm 193,756	239,985 \pm 236,295	0,6370
Travoprostas ^{BAK 0,015%}	196,827 \pm 106,495	387,515 \pm 218,226	0,0231*
Travoprostas ^{PQ}	195,765 \pm 197,387	255,326 \pm 240,933	0,5529
Tafluprostas ^{BAKFREE}	281,990 \pm 262,987	448,348 \pm 176,748	0,1142
Solução controle ^{BAK}	157,001 \pm 196,961	206,664 \pm 228,882	0,7226

*Os valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados significantes.

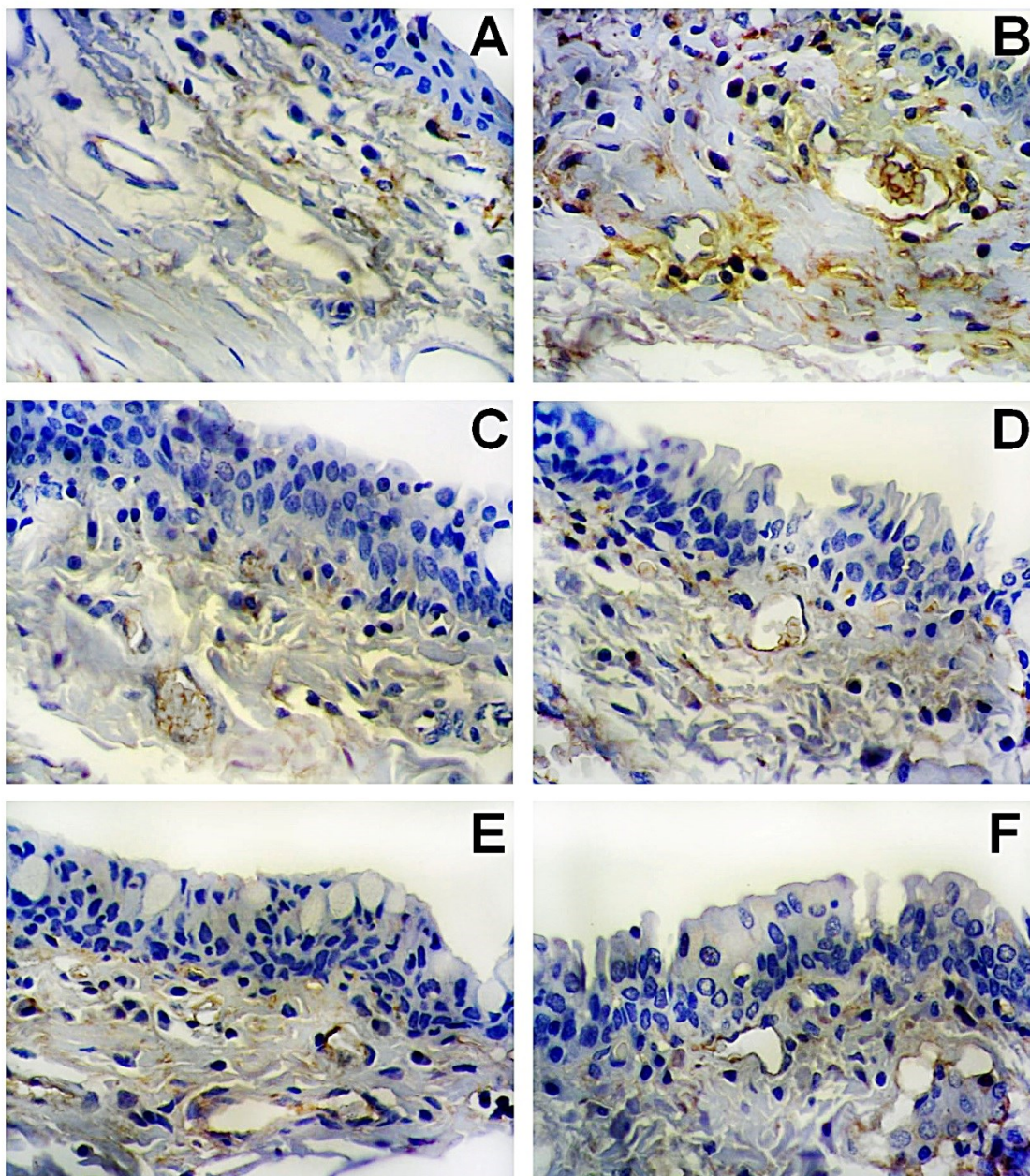


Figura 3.4 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-VCAM. A e B se referem à droga travoprost^{BAK}. C e D à Travoprost^{PQ}. E e F à solução controle^{BAK}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foi maior no olho esquerdo (B) que no direito (A), em contraste com a contracoloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença entre as comparações de (C e D) e (E e F).

3.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a terapia tópica com drogas análogas de prostaglandina (APG), comumente utilizadas em pacientes com glaucoma, podem induzir alterações na superfície ocular de coelhos saudáveis por meio da modificação do padrão celular normal. Estas alterações não resultaram em variação na sensibilidade da córnea (SC) e não variaram o teste lacrimal de Schirmer (TLS).

Aparentemente, os conservantes utilizados nas formulações oftálmicas para evitar a contaminação do produto ou para aumentar a permeabilidade das drogas sobre a conjuntiva têm sido considerados os principais suspeitos para o desenvolvimento de reações adversas.^{15,16,25,26} Todavia, nos estudos mais atuais, uma série de evidências têm demonstrado que os conservantes não são os únicos agentes envolvidos no processo que desencadeia a cascata da resposta inflamatória da superfície ocular, durante a terapia prolongada com drogas antiglaucomatosa. As próprias drogas em si, podem resultar em alterações e danos em pacientes usuários, seja pelo efeito cumulativo, pela frequência de uso e duração do tratamento ou ainda por uma predisposição do paciente que pode apresentar outra doença ocular pre-existente.²⁷ Na tentativa de reduzir os efeitos adversos dos conservantes, uma série de drogas estão sendo formuladas sem a adição de conservantes, o que certamente representa uma inovação importante para redução de parte dos efeitos adversos.²⁸

A diminuição da SC foi descrita anteriormente em seres humanos tratados com latanoprost^{BAK}, bimatoprost^{BAK} e travoprost^{BAK},¹⁹ porém o resultado da SC pode variar caso a caso, como observado em outro estudo onde outros pacientes tratados com latanoprost^{BAK} não apresentaram alteração significativa da SC.^{20,21} Uma limitação da análise da SC pela estesiometria, talvez seria que, o resultado observado sofre uma variação intra e inter-individual considerável na interpretação dos resultados, o que poderia dificultar a comparação entre diferentes estudos realizados por diferentes pesquisadores.²⁹

Considerando a absorção conjuntival e ocular das drogas, é óbvio pressupor que os olhos tratados com drogas antiglaucomatosas deveriam apresentar uma redução na PIO.³⁰ A redução da PIO foi observada todos os olhos dos coelhos tratados com APG, exceto para a solução controle^{BAK}, que foi semelhante à observada em coelhos relatada pela literatura.²²

A presença de células caliciformes na conjuntiva participa ativamente da manutenção da estabilidade do filme lacrimal. Os processos inflamatórios e estímulos tóxicos à conjuntiva podem resultar em uma importante redução da quantidade de células caliciformes,³¹ porém, após a retirada do estímulo causador, foi descrito que estas apresentam boa capacidade de regeneração.³² A redução do número de células caliciformes após o uso de terapias antiglaucomatosas, tanto a curto quanto a longo prazo de tratamento, esteve relacionada à presença do conservante BAK nestas formulações.^{14,33}

Em nossa pesquisa, o número de células caliciformes apresentou um aumento significativo após os 30 dias de tratamento em todos os grupos que receberam APG, associados ou não ao BAK. Este aumento, contraditório à parte da literatura, também foi observado em pessoas tratadas com latanoprost durante 30 dias, porém seguido por um decréscimo do número de células caliciformes ao longo de seis meses de acompanhamento.³⁴ Este mesmo achado foi detectado em coelhos, após o oitavo dia de tratamento com travoprost^{BAK}, e após 30 dias de tratamento com latanoprost^{BAK} e bimatoprost^{BAK}.¹⁵

Em outro estudo, foi observado que os efeitos de redução da quantidade de mucina e células caliciformes decorrentes da inflamação e toxicidade promovida pelo BAK foi menor nos grupos que receberam latanoprost^{BAK}, do que nos grupos que receberam apenas o BAK isoladamente.¹⁴ E considerando ainda o uso prolongado de APG, foi descrito que o cultivo de células da conjuntiva de seres humanos³⁵ e de coelhos³⁶ apresentaram boa tolerância ao tratamento com Tafluprost^{BAKFREE} durante terapia prolongada, sem uma citotoxicidade evidente. O que nos remete a crer que a presença do BAK é responsável pelo desenvolvimento das lesões descritas anteriormente, e que a curto prazo, os APG podem atuar exercendo algum efeito protetor às células caliciformes.¹⁵

A inflamação dos vasos sanguíneos frequentemente altera a morfologia celular do endotélio vascular,^{36,37} causando um aumento da espessura da parede vascular (EPV). Nesta pesquisa o aumento da EPV da conjuntiva dos coelhos esteve presente nos tratamentos com latanoprost^{BAK0,02%}, bimatoprost^{BAK0,005%} e travoprost^{BAK0,015%}, sem variação da EPV nos olhos tratados com travoprost^{PQ} e tafluprost^{BAKFREE}. Esta observação corrobora com outros estudos que

demonstraram que a tafluprosta^{BAKFREE} não promove alterações importantes tanto em vasos sanguíneos quanto linfáticos durante o tratamento.³⁸ Os APG que causaram aumento da EPV foram aqueles os quais estavam associados ao conservante BAK, fazendo-nos crer que o efeito do BAK sobre a superfície da conjuntiva poderia ser o responsável pelo desenvolvimento destas alterações observadas em nossa pesquisa. Outros estudos observaram que o tratamento com drogas antiglaucomatosas contendo BAK, durante 30 dias, pode resultar em grande inflamação da conjuntiva,²⁷ e o uso de drogas livres de conservante poderia ser uma alternativa para preservar a saúde ocular. Curiosamente, a solução controle^{BAK} utilizada em nossa pesquisa não resultou em alteração na EPV, como observado nas drogas APG^{BAK}. Talvez o efeito sinérgico do BAK com a droga APG tenha atuado como um potencializador da resposta pró-inflamatória vascular, resultando em maior edema do endotélio vascular, aumentando desta forma a EPV nos olhos tratados com APG^{BAK}.

Durante a inflamação vascular, ocorre a ativação de moléculas de adesão celular no endotélio dos vasos,⁴⁰ que por sua vez contribui para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de linfócitos, monócitos basófilos e eosinófilos. A detecção de moléculas de adesão celular (VCAM-1) foi observada apenas nos olhos tratados com travoprosta^{BAK 0,015%}. Para as demais drogas, houve uma relativa tendência no aumento da resposta ao VCAM-1, todavia sem comprovação estatística. Russ *et al* (2007) obtiveram uma resposta vascular mais evidente na conjuntiva de coelhos tratados com latanoprosta^{BAK0,02%} durante 30 dias, porém não foi realizada uma pesquisa para detecção específica de moléculas de adesão celular (VCAM-1).¹⁵ Dentre as drogas estudadas, a travoprosta é a droga que apresenta maior concentração de BAK^{0,015%}. Talvez, durante um período mais prolongado de tratamento, as demais drogas associadas ao BAK, incluindo a solução controle^{BAK}, poderiam resultar em alterações vasculares mais expressivas. Uma limitação da pesquisa é que a avaliação para detecção de moléculas de adesão foi realizada apenas após 30 dias de tratamento, não sendo possível determinar se as demais drogas apresentaram um aumento significativo nos primeiros dias de tratamento, seguidos por uma redução da resposta vascular, ou se o aumento da resposta vascular, apesar de lento e progressivo, não foi suficiente para ser considerado estatisticamente significativo. Para melhor compreensão da resposta inflamatória

aguda e crônica do endotélio vascular, outros estudos precisam ser desenvolvidos.

Estudos histológicos e de citologia de impressão da conjuntiva de pessoas demonstraram que os olhos de pacientes tratados com drogas antiglaucomatosas aumentam a resposta celular à inflamação.^{33,41-43} A fase inicial da inflamação foi caracterizada por uma resposta que cursa com vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, edema, e é seguida pela fase tardia com infiltração de células inflamatórias, especialmente linfócitos e macrófagos.^{36,44}

O aumento da resposta à inflamação mediada por macrófagos reativos na conjuntiva dos coelhos tratados com APG^{BAK} e a ausência de resposta para as drogas tafluprosta^{BAKFREE} e travoprostas^{PQ}, que não continham BAK, sugerem que a presença do BAK pode ter sido responsável pelo aumento da resposta macrófágica (anti-RAM11). Semelhante às observações de Liang et al (2012),³⁶ acreditamos que o conservante BAK presente nestas formulações, mesmo em concentrações variadas em cada droga, foi o responsável por promover parte da inflamação da conjuntiva, devido ao seu efeito citotóxico local e talvez por exercer uma ação direta sobre os próprios macrófagos. Um estudo recente, realizado *in vitro*, refere que o BAK apresenta um efeito direto sobre os macrófagos, capaz de estimular o aumento da fagocitose e a liberação de citocinas.⁴⁵ Este trabalho concluiu que a exposição prolongada ao BAK, mesmo em baixas concentrações, durante uma terapia crônica foi considerado um fator estimulante responsável pela ativação de macrófagos na inflamação.⁴⁵

Uma comparação entre a resposta inflamação da conjuntiva de pessoas tratadas com drogas antiglaucomatosas por períodos prolongados e pessoas saudáveis sem tratamento demonstrou um aumento do número de linfócitos-T e linfócitos-T de memória nos pacientes que receberam tratamento.⁴⁶

A estimulação de linfócitos-T reativos (resposta anti-CD45RO) detectada na conjuntiva dos coelhos tratados com travoprostas^{BAK 0,015%}, bimatoprostas^{BAK 0,005%}, tafluprostas^{BAKFREE} e latanoprostas^{BAK 0,02%} sugere que os próprios APG possam influenciar na resposta linfocitária, uma vez que ambos APG^{BAK} e APG^{BAKFREE} resultaram em alterações estatisticamente significativas. Porém o mecanismo envolvido nesta resposta ainda precisa ser melhor compreendido. A presença do BAK na travoprostas^{BAK 0,015%} que estimulou linfócitos-T (resposta

significativa anti-CD45RO) e travoprost^{PQ} que não alterou a resposta, sugere que o conservante BAK também contribua para desencadear a inflamação.

Um estudo que comparou o efeito da tafluprost^{BAKFREE} com latanoprost^{BAK0,02%} e com apenas o conservante BAK, demonstrou um aumento discreto de linfócitos CD45+ na conjuntiva tratada com tafluprost, e um aumento expressivo dos linfócitos CD45+ para latanoprost e para BAK.¹⁷ Este estudo sugeriu que o BAK isolado ou associado à APG exerce um efeito direto pró-inflamatório sobre a superfície ocular.¹⁷ Em nossa pesquisa, a solução controle^{BAK} apresentou uma tendência à aumentar a ativação de linfócitos-T reativos, porém sem importância estatística. Acreditamos que o uso prolongado desta solução^{BAK}, num período superior aos 30 dias realizados, poderia resultar em uma resposta semelhante à observada por Liang, et al (2008),¹⁷ todavia a metodologia empregada para avaliação no trabalho foi diferente.

Russ *et al* (2007)¹⁵ observaram a presença de um infiltrado inflamatório moderado na conjuntiva de coelhos tratados com APG, porém sem grandes alterações histopatológicas do estroma conjuntival, e Galletti *et al* (2013)⁴⁷ constataram efeitos citotóxicos do BAK sobre o epitélio da superfície e ocular, concluindo que este conservante pode interferir na resposta imune da conjuntiva.

O uso de APG durante 30 dias de tratamento resultou em alterações inflamatórias na conjuntiva de coelhos, apresentando uma resposta mais deletéria da inflamação quando a droga esteve associada ao conservante BAK, do que quando este não estava presente. Um período mais prolongado de tratamento poderá fornecer maiores informações sobre a intensidade das lesões avaliadas neste estudo, todavia o uso de drogas antiglaucomatosas com outros tipos de conservante ou sem adição deve contribuir para uma melhor saúde da superfície ocular.

Agradecimentos

Este trabalho foi inteiramente financiado pela Merck Sharp & Dohme (MSD, França). Gostaríamos de agradecer ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná - HVUFPR e ao Laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR.

3.5 REFERÊNCIAS

1. Dautriche CN, Xie Y, Sharfstein ST. Walking through trabecular meshwork biology: Toward engineering design of outflow physiology. *Biotechnology Advances* 2014; 14: 1-13.
2. Baudouin C, Labbe´ A, Liang H, et al (2010) Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 29: 312–334.
3. Servat JJ, Bernardino CR (2011) Effects of common topical antiglaucoma medications on the ocular surface, eyelids and periorbital tissue. *Drugs Aging* 28: 267–282.
4. Lester M, Telani S, Frezzotti P, Motolese I, Figus M, Fogagnolo P, Perdicchi A. Ocular Surface Changes in Glaucomatous Patients Treated With and Without Preservatives Beta-Blockers. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 00; 00: 2014. DOI: 10.1089/jop.2013.0216
5. Rummenie VT, Matsumoto Y, Dogru M, et al (2008) Tear cytokine and ocular surface alterations following brief passive cigarette smoke exposure. *Cytokine* 43: 200–208.
6. Tarabishy AB, Jeng BH (2008) Bacterial conjunctivitis: a review for internists. *Cleve Clin J Med* 75: 507–512.
7. Ueta M, Kinoshita S (2010) Ocular surface inflammation mediated by innate immunity. *Eye Contact Lens* 36: 269–281.
8. Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A, Zeyen T (2007) Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *European Journal of Ophthalmology* 17: 341-349.
9. Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D, Hamard P, Hreiche R, et al. (2005) CCR 4 and CCR 5 expression in conjuntival specimens as differential markers of T(H)1/T(H)2 in ocular surface disorders. *J Allergy Clin Immunol* 116: 614–619.
10. Baudouin C, Liang H, Hamard P, Riancho L, Creuzot-Garcher C, et al. (2008) The ocular surface of glaucoma patients treated over the long term expresses inflammatory markers related to both T-helper 1 and T-helper 2 pathways. *Ophthalmology* 115: 109–115.
11. Martone G, Frezzotti P, Tosi GM, Traversi C, Mittica V, et al. (2009) An in vivo confocal microscopy analysis of effects of topical antiglaucoma therapy with preservative on corneal innervation and morphology. *Am J Ophthalmol* 147: 725–735.
12. Ammar 2011, Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell PA (2009) Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjuntival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 25:113–119.

13. Mastropasqua L, Agnifili L, Fasanella V, Curcio C, Ciabattoni C, Mastropasqua R, Toto L, Ciancaglini M (2013) Conjunctival goblet cells density and preservative-free tafluprost therapy for glaucoma: an in vivo confocal microscopy and impression cytology study. *Acta Ophthalmol* 91: e397–e405.
14. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, et al. (2004) Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1360–1368.
15. Russ HH, Costa VP, Ferreira FM et al. (2007) Conjunctival changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate: a histomorphometric study. *Arq Bras Oftalmol* 70: 910–916.
16. Faria NVL, Russ HH, Rose P, Noronha L, Mello PA, Montiani-Ferreira F, Sobrinho SC (2013) Conjunctival changes and inflammatory aspects in rabbits' conjunctivas induced by fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol maleate. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 3: 22.
17. Liang H, Baudouin C, Pauly A et al. (2008) Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short- and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0.02% benzalkonium chloride. *Br J Ophthalmol* 92: 1275–1282.
18. Kahook MY, Noecker RJ (2008) Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofzia, latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears. *Cornea* 27: 339–343)
19. Kozobolis VP, Detorakis ET, Maskaleris G, Koukoura SC, Fountoulakis N, Chrysochoou F, Konstas AG (2005) Corneal sensitivity changes following the instillation of latanoprost, bimatoprost, and travoprost eyedrops. *Am J Ophthalmol* 139: 742-743.
20. Thygesen J, Aaen K, Theodorsen F, Kessing SV, Prause JU (2000) Short-term effect of latanoprost and timolol eyedrops on tear fluid and the ocular surface in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Acta Ophthalmol Scand* 78: 37-44.
21. Terai N, Müller-Holz M, Spoerl E, Pillunat LE (2011) Short-term effect of topical antiglaucoma medication on tear-film stability, tear secretion, and corneal sensitivity in healthy subjects. *Clin Ophthalmol* 5: 517–525.
22. Wang X, Dong J, Wu Q (2013) Twenty-four-hour measurement of IOP in rabbits using rebound tonometer. *Vet Ophthalmol*. 2013 Jan 1. doi: 10.1111/vop.12020. [Epub ahead of print]

23. Kontiola AI, Goldblum D, Mittag T et al. (2001) The induction/impact tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. *Experimental Eye Research* 73: 781–785.
24. Goldblum D, Lontiola AI, Mittag T et al. (2002) Non-invasive determination of intraocular pressure in the rat eye. Comparison of an electronic tonometer (TonoPen), and a rebound (impact probe) tonometer. *Graefe's Archives Clinical Experimental Ophthalmology* 240: 942–946.
25. Yalvaç IS, Gedikoğlu G, Karagöz Y, Akgün U, Nurözler A, Koç F, Kasim R, Duman S (1995). Effects of antiglaucoma drugs on ocular surface. *Acta Ophthalmol Scand* 73: 246-248.
26. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F (2005) In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 4594-4599.
27. Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R (2004) Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea* 23: 490-496.
28. Lewis RA, Katz GJ, Weiss MJ, et al. (2007) Travoprost 0.004% with and without benzalkonium chloride: a comparison of safety and efficacy. *J Glaucoma* 16: 98–103.
29. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, Gain P (2007) Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 48: 2062-2067.
30. Hoyng PF, van Beek LM (2000) Pharmacological therapy for glaucoma: a review. *Drugs*. 59: 411-434.
31. Arici MK, Arici DS, Topalkara A, Güler C (2000) Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol* 28: 113-7.
32. Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M & Milazzo G (2002) Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br J Ophthalmol* 86: 181–184.
33. Herreras JM, Pastor JC, Calonge M et al. (1992) Ocular surface alteration after longterm treatment with an antiglaucomatous drug. *Ophthalmology* 99: 1082–1088.
34. Moreno M, Villena A, Cabarga C et al. (2003) Impression cytology of the conjunctival epithelium after anti-glaucomatous treatment with latanoprost. *Eur J Ophthalmol* 13: 553–559.

35. Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L et al. (2008) In vitro effects of preservative- free tafluprost and preserved latanoprost, travoprost, and bimatoprost in a conjunctival epithelial cell line. *Curr Eye Res* 33: 303–312.
36. Liang H, Baudouin C, Labbe A, Riancho L, Brignole-Baudouin F (2008) Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue (CALT) Reactions to Antiglaucoma Prostaglandins with or without BAK-Preservative in Rabbit Acute Toxicity Study. *Plos One*. 2012; 7: 1-9.
37. Burton AC (1954) Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *The American Physiological Society* 34: 619-642.
38. Moore SA, Bohlen HG, Miller BG, Evan AP (1985) Cellular and vessel wall morphology of cerebral cortical arterioles after short-term diabetes in adult rats. *Blood Vessels* 22: 265-277.
39. Hos D, Koch KR, Bock F, Grajewski RS, Dietlein TS, Cursiefen C, Heindl LM (2013) Short- and long-term corneal vascular effects of tafluprost eyedrops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 251: 1919-1927.
40. Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky ML, Langille BL (1995) Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15: 2-10.
41. Brandt JD, Wittpen JR, Katz LJ et al. (1991) Conjunctival impression cytology in patients with glaucoma using long term topical medication. *Am. J. Ophthalmol* 112: 297–301.
42. Mietz H, Niesen U, Krieglstein GK (1994) The effect of preservatives and antiglaucomatous medication on the histopathology of the conjunctiva. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 232, 561–565.
43. Becquet F, Goldschild M, Moldovan MS et al. (1998) Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneconjunctival surface. *Curr. Eye Res* 17: 419–425.
44. Niederkorn JY (2008) Immune regulatory mechanisms in allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 472–476.
45. Michée S, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Rostene W, Baudouin C, Labbé A (2013) Effects of benzalkonium chloride on thp-1 differentiated macrophages in vitro. *Plos One* 8: e72459.
46. Helin M, Rönkkö S, Puustjärvi T, Teräsvirta M, Ollikainen M, Uusitalo H (2011) Conjunctival inflammatory cells and their predictive role for deep sclerectomy in primary open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 20: 172-178.

47. Galletti JG, Gabelloni ML, Morande PE, Sabbione F, Vermeulen ME, Trevani AS, Giordano MN (2013) Benzalkonium chloride breaks down conjunctival immunological tolerance in a murine model. *Mucosal Immunology* 6, 24–34.

4. CAPÍTULO – 4

COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DA CONJUNTIVA DE COELHOS INDUZIDAS PELO USO TÓPICO DE BETA BLOQUEADORES, INIBIDORES DA ANIDRASE CARBÔNICA, ALFA-AGONISTAS E COMBINAÇÕES FIXAS DE AMBOS, COM E SEM CONSERVANTES.

RESUMO

Objetivos: Avaliar e comparar alterações induzidas na conjuntiva de coelhos tratados topicamente com alfa-agonistas, beta bloqueadores, inibidores da anidrase carbônica e combinações fixas de ambos, contendo cloreto de benzalcônio (BAK), e sem a presença de conservantes (*bakfree*), avaliando testes clínicos, histomorfométricos e imuno-histoquímicos.

Material e métodos: Um total de 60 coelhos (120 olhos) foram divididos em seis grupos, tratados diariamente durante 30 dias com: dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}, dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}, brinzolamida 1% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}, brimonidina 0,2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}, e solução controle^{BAK}. Apenas o olho esquerdo foi tratado, sendo o direito usado como controle. Avaliou-se o teste lacrimal de Schirmer (TLS), sensibilidade da córnea (SC) e a pressão intra-ocular (PIO) antes e após o tratamento. Foi mensurada pela histomorfometria da conjuntiva o número de células calciformes do epitélio e a espessura da parede vascular (EPV) do estroma subjacente. Avaliou-se ainda marcadores imuno-histoquímicos de inflamação como macrófagos reativos (RAM11), endotélio vascular reativo (VCAM-1) e linfócitos reativos (CD45RO).

Resultados: Não foram observadas alterações na SC e TLS. A PIO reduziu em todos os olhos tratados com as drogas, exceto para a solução controle^{BAK}. O número de células calciformes e a EPV não variou em nenhum dos tratamentos realizado. O aumento da resposta macrofágica foi observado em todos os grupos que possuíam BAK como conservante. A inflamação do endotélio vascular não foi detectada em nenhuma das drogas. O aumento de linfócitos reativos foi observado apenas na conjuntiva dos coelhos tratados com a associação de dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}.

Discussão: Os inibidores da anidrase carbônica, beta bloqueadores e combinações fixas utilizados neste estudo parecem exercer uma resposta inflamatória da conjuntiva pouco evidente aos testes clínicos oftálmicos, porém com alteração da resposta macrofágica. A estimulação de macrófagos reativos esteve relacionada à presença do conservante BAK nas formulações. As alterações vasculares não foram detectadas de forma importante, sendo a estimulação da resposta de linfócitos-T reativos mais nítida apenas na associação de dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}, sugerindo certa toxicidade desta associação, durante os 30 dias de tratamento.

Palavras-chave: Tratamento do glaucoma; inflamação da conjuntiva, cloreto de benzalcônio, histomorfometria, imuno-histoquímica .

4.1 INTRODUÇÃO

O glaucoma é a segunda enfermidade mais importante na população mundial, que pode resultar em déficit visual significativo, progredindo na maior parte dos casos não tratados para a cegueira.^{1,2} A terapia instituída às pessoas com glaucoma constitui da utilização terapêutica de formulações antiglaucomatosas durante muitos anos, o que por sua vez, pode resultar em alterações da superfície ocular e inflamação da conjuntiva.³⁻⁴

A superfície ocular reage de forma específica a uma grande variedade de agressores externos, tais como poluição do ar, alterações climáticas, contaminação com agentes infecciosos, alergia e ao tratamento tópico com drogas oftálmicas.⁴⁻⁷

Os efeitos adversos observados na conjuntiva após o uso de drogas oftálmicas (colírios) pode ser consequência da ação da própria droga sobre a conjuntiva, decorrente da presença de determinados tipos de conservantes nas formulações, ou ainda, da ação conjunta de ambos. O conservante mais utilizado nas formulações oftálmicas é o cloreto de benzalcônio – *benzalkonium chloride* (BAK).⁸ Os efeitos tóxicos deste conservante estão bem relatados na literatura médica oftálmica e compreende uma grande variedade de mecanismos diretos e indiretos, que envolvem o sistema imune local, o epitélio corneano e conjuntival, o filme lacrimal, podendo interferir na sensibilidade neurológica da córnea e conjuntiva.⁹⁻¹¹

O efeito detergente do BAK pode resultar em diminuição da quantidade de células caliciformes da conjuntiva, sendo descrito como um dos responsáveis pela indução à alteração da estabilidade do filme lacrimal, que por sua vez contribui para intensificar a inflamação ocular, aumento a liberação de linfócitos reativos, macrófagos reativos durante a terapia crônica.^{12,13}

Entre as principais classes de drogas utilizadas para o tratamento clínico do glaucoma encontram-se os agentes colinérgicos, beta bloqueadores, agonistas alfa adrenérgicos, inibidores da anidrase carbônica, análogos de prostaglandina (APG) e combinações fixas destas drogas associadas ao maleato de timolol,¹⁴⁻¹⁶ sendo a maioria delas associada ao conservante BAK. Na tentativa de reduzir os efeitos adversos do BAK, foram desenvolvidos estudos com o uso de drogas antiglaucomatosas sem adição de conservante (*backfree*),

com aparente redução da prevalência de sinais clínicos de desconforto ocular em pessoas.^{14,17}

A presença do BAK nas formulações oftálmicas esteve relacionada ao desenvolvimento de alterações da superfície ocular, que a longo prazo pode resultar em inflamação da conjuntiva, acometendo a função fisiológica normal celular e imunológica local.¹⁷⁻²⁰ Alguns destes efeitos adversos foram anteriormente estudados em ensaios clínicos com pessoas sob terapia antiglaucomatosa, avaliando-se alterações em determinados testes oftálmicos; outros utilizando cultivo celular, e outros com uso de animais como modelo experimental. Até agora, não há um estudo controlado que tenha sido realizado em coelhos, avaliando o efeito do uso de inibidores da anidrase carbônica, beta bloqueadores e combinações fixas de ambos com e sem conservante, mensurando na mesma pesquisa as alterações da morfologia celular da conjuntiva, detecção imuno-histoquímica de marcadores de inflamação e avaliação de modificações de testes oftálmicos específicos.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar e comparar o efeito do uso de estas drogas comercializadas para terapia do glaucoma em pessoas, associados ou não ao conservante, sobre a conjuntiva de coelhos saudáveis, para detecção de alterações em determinados testes oftálmicos, modificações histomorfométricas e detecção imuno-histoquímica de mediadores inflamatórios da conjuntiva, após o tratamento tópico contínuo durante 30 dias.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos que envolveram a utilização de animais vivos foram conduzidos de acordo com as “Normas para uso de animais em Pesquisas Oftalmológicas” da ARVO (*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*) e de acordo com as exigências aprovadas pela Comissão de Ética no uso de animais no Setor de Ciências Agrárias CEUA-SCA da Universidade Federal do Paraná.

Foram selecionados aleatoriamente sessenta coelhos brancos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) de um criador comercial local. Todos os

animais (27 machos e 33 fêmeas) apresentaram peso médio aproximado (2,5 Kg) e idade média de 5 meses.

Os coelhos foram transportados em gaiolas apropriadas para o Vivário de Oftalmologia Comparada da Universidade Federal do Paraná (criado e desenvolvido especialmente para esta pesquisa) onde cada grupo permaneceu durante 40 dias. Antes de se iniciar o tratamento, os animais foram desverminados e reavaliados clínica e oftalmologicamente, realizando-se um exame físico completo dos indivíduos.

Durante a fase de adaptação ao ambiente experimental, os coelhos permaneceram sob adaptação por 10 dias sem tratamento, acomodados em gaiolas com água filtrada e comida à vontade (ração comercial de coelho e feno de alfafa e/ou verduras frescas). No oitavo dia de adaptação, em um momento anterior ao início do tratamento, foram realizados testes oftálmicos específicos para determinar parâmetros de interesse do estudo. Ao término do décimo dia de adaptação, deu-se início ao tratamento propriamente dito, que fora mantido durante 30 dias consecutivos, de acordo com a droga de cada grupo experimental.

Os parâmetros clínicos oftálmicos mensurados antes do tratamento foram novamente mensurados ao término do tratamento, mantendo-se o mesmo horário de avaliação realizado no momento inicial.

As drogas utilizadas nesta pesquisa foram selecionadas de acordo com as apresentações farmacológicas comerciais (colírios) de beta bloqueadores, inibidores da anidrase carbônica, alfa-agonistas e combinações fixas associados com o conservante cloreto de benzalcônio (BAK), ou sem associação de conservantes, ditos como livres de conservante (*backfree*).

Os animais foram divididos em seis grupos contendo 10 animais cada, sendo tratados com dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK 0,0075%} (Cosopt® - MSD - Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP, Brasil), Dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE} (Cosopt® - MSD - Merck Sharp & Dohme France, Paris, France), Brinzolamida 1% + maleato de timolol 0,5%^{BAK 0,005%} (Azorga® - Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), Brimonidina 0,2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK 0,005%} (Combigan® Allergan Indústria Farmacêutica Ltda., Guarulhos, SP, Brasil), maleato de timolol 0,5%^{BAK 0,005%} (Timoptol® - MSD - Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP,

Brasil) e uma solução controle^{BAK 0,01%} (solução salina associada ao cloreto de benzalcônio 0,01%, Ophthalmos Farmácia Oftalmológica de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil). Todos os grupos foram tratados apenas no olho esquerdo, instilando-se uma gota da droga a cada 12 horas, em horários fixos às 8 horas da manhã e 20 horas. O olho direito serviu como controle para o tratamento, não recebendo medicação. Todas as drogas utilizadas podem ser visualizadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Drogas oftálmicas utilizadas para o tratamento do olho esquerdo de coelhos brancos da raça Nova Zelândia, de acordo com o respectivo número de animais (N) e o nome comercial do produto.

Drogas	N	Nome comercial
Dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	10	Cosopt* ¹
Dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	10	Cosopt* ²
Brinzolamida 1% + maleato de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	10	Azorga ³
Brimonidina 0,2% + maleato de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	10	Combigan ⁴
Maleato de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	10	Timoptol ⁵
Solução controle ^{BAK 0,01%}	10	BAK** ⁶

*Não há diferenças entre o nome comercial do Cosopt® associado ao conservante cloreto de benzalcônio (BAK) e ao Cosopt® sem conservante (BAKFREE)

**BAK = cloreto de benzalcônio

1 – Cosopt® colírio (MSD - Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP, Brasil).

2 – Cosopt® colírio (MSD - Merck Sharp & Dohme France, Paris, France).

3 – Azorga® colírio (Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

4 – Combigan® colírio (Allergan Indústria Farmacêutica Ltda., Guarulhos, SP, Brasil).

5 – Timoptol® colírio (MSD - Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP, Brasil).

6 – Cloreto de Benzalcônio (Ophthalmos Farmácia Oftalmológica de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil).

Testes oftálmicos

Foram avaliados um total de 120 olhos de 60 coelhos saudáveis. As estruturas oculares do segmento anterior foram avaliadas por meio do uso de uma fonte de luz de um transiluminador tipo *Finoff* (Welch Allyn, Skaneateles Falls, NY, USA) e um biomicroscópio com lâmpada de fenda (Hawk Eye; Dioptrix, L'Union, France). Os testes oftálmicos foram realizados por um único avaliador (LL), para evitar diferenças de interpretação interobservador. Os coelhos foram avaliados individualmente, contidos com auxílio de toalhas enrolada ao redor do corpo, tomando-se o cuidado para manter o animal sem desconforto.

Quando a cabeça do animal era manualmente estabilizada, havia-se o cuidado para não se realizar compressão sobre a região do pescoço, na tentativa de prevenir mensurações errôneas da pressão intraocular (PIO). A sequência de realização dos testes oftálmicos foi pré-determinada em: (1) Inspeção ocular; (2) mensuração da sensibilidade da córnea por meio da estesiometria; (3) teste lacrimal de Schirmer (TLS) e (4) mensuração da PIO por tonometria. Os parâmetros de umidade e temperatura foram monitorados durante todos os testes, apresentando umidade que variou entre 70 a 73% e temperatura oscilando entre 21 a 23°C.

Sensibilidade da córnea (SC)

A avaliação da sensibilidade central da córnea foi realizada em ambos os olhos em todos os coelhos por meio da utilização de um estesiômetro de Cochet-Bonnet (*Luneau Ophtalmologie, Chartres Cedex, França*). Este instrumento possui um monofilamento de náilon com espessura pré-definida (0,12 mm), o qual é aplicado perpendicularmente sobre a superfície central da córnea, variando-se o teste entre diferentes comprimentos de fio. A mensuração foi obtida por meio da observação do estímulo produzido pelo toque do filamento sobre a córnea, o qual é necessário para desencadear o reflexo de piscar.

Neste estudo, somente a região central da córnea foi avaliada pelo toque, realizando-se uma mensuração repetida por três vezes em um mesmo comprimento de fio. Caso o animal não apresentasse o estímulo, o valor do comprimento do filamento era reduzido em 0,5 cm, repedindo-se as mensurações, até que cada coelho viesse a responder com o reflexo do fechamento palpebral.

A avaliação do teste permite comparar o comprimento de fio necessário para causar a resposta ao estímulo (mensurado em centímetros), com a sensibilidade da área central corneana.

Teste lacrimal de Schirmer (TLS)

Para mensuração do teste lacrimal de Schirmer (TLS) tipo 1, o qual mensura a produção basal e parte da produção reflexa da fração aquosa do filme

lacrimal, foram utilizadas tiras de papel estéril de TLS padronizado (Ophthalmos - Farmácia Oftalmológica de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil) em ambos os olhos de todos animais. A fração aquosa da lágrima foi mensurada em milímetros durante sessenta segundos.

Pressão intraocular (PIO)

A pressão intraocular (PIO) foi mensurada em todos os olhos, utilizando-se um tonômetro de rebote digital (Tonovet®, Lumic International, Baltimore, MD, USA). Não foi utilizado colírio anestésico para a mensuração da PIO e o sistema de avaliação do tonômetro foi calibrado para o modo personalizado para espécies de animais indefinidos. Este tipo de tonômetro usa uma probe eletromagnética que fornece um valor médio calculado entre 6 mensurações consecutivas, utilizando-se a região corneana central para estimativa da PIO média.

Eutanásia e coleta de amostras

Após o tratamento ininterrupto durante 30 dias, os animais foram eutanasiados de acordo com as normas do Código de Ética do Médico Veterinário, por meio de injeção intravesona em bolus de anestésico pentobarbital (200 mg/Kg). Após o óbito, foram coletados os olhos inteiros e o tecido periocular (pálpebras), sendo imediatamente fixadas em solução de formol a 10% tamponada, na proporção de volume 1:10, permanecendo em imersão durante 24 horas para fixação.

Análise histomorfométrica e imuno-histoquímica

Após a fixação, os olhos foram seccionados em seu eixo longitudinal sendo submetido ao processamento histotécnico padrão (Faria, 2013). Os cortes do bloco parafinado foram realizados com espessura de 5 µm, sendo montados em lâminas de vidro (Starfrost adhesive slide, Waldemar Knittel GmbH, Hamburg, Alemanha) sendo corados com corante de HE (Hematoxilina-Eosina) e PAS (ácido periódico de Schiff).

A análise histomorfométrica quantitativa da conjuntiva foi realizada para avaliar a presença de infiltrado inflamatório, contagem do número de células calciformes e mensuração da espessura da parede vascular (EPV). A avaliação

qualitativa óptica foi realizada em seguimentos lineares de conjuntiva de 200 μm . Para a análise morfométrica quantitativa utilizou o software *Image Pro-Plus* versão 4 (IP4) (*Media Cybernetics, Silver Spring, MD*).

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada com captação de imagens com magnificação de 400x, utilizando o mesmo software. Cada imagem, foi virtualmente gradeada (150 X 200 Wm) realizando-se análise detalhada específica da região epitelial e do estroma subjacente da conjuntiva. As mensurações realizadas foram desenvolvidas por um único avaliador, para evitar divergências inter-observador.

A análise imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada com três anticorpos distintos para a detecção de: (1) macrófagos reativos, com um anticorpo monoclonal de coelho - *rabbit anti-macrophage* - RAM11 (DakoCytomation, CA, EUA, na diluição 1:800); (2) linfócitos-T reativos, com anticorpo anti-CD45RO (BD Biosciences Pharmingen, EUA, na diluição 1:800) e (3) inflamação vascular, que marca moléculas de adesão nas células do endotélio vascular reativo - *reactive vascular cellular adhesion molecule* - VCAM-1 (Novocastra Laboratories Ltd, Inglaterra, na diluição 1:200). Estes três marcadores foram escolhidos por apresentar alta afinidade pelos sítios de ação em situação de inflamação crônica que curse com reação de macrófagos, linfócitos e alterações no endotélio vascular em coelhos.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP). Os testes oftálmicos foram analisados em cada droga utilizada, comparando-se os resultados obtidos antes e após o tratamento (média \pm DP) dos olhos esquerdo (tratados) e dos olhos direito (controle) usando um teste-*t* com significância de 5%. A análise histomorfométrica e os valores de IHQ foram comparados apenas no período pós-tratamento. Para isso foi realizado teste *One-way* ANOVA, com nível de significância de 5%, para comparar as variáveis contínuas numéricas. Caso fosse detectado significância estatística, os dados foram submetidos ao pós-teste de Tukey-Kramer (Statview V; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $P < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

Testes Oftálmicos

Sensibilidade da córnea

A comparação da sensibilidade da córnea (SC) avaliada antes e após o tratamento não apresentou alteração significativa para nenhuma das drogas testadas ($P > 0,05$). Todos os valores da SC (média \pm DP) com os respectivos valores de P podem ser visualizados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Valores da sensibilidade da córnea (SC) observados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP.

Drogas	SC antes do tratamento (cm)	SC após o tratamento (cm)	Valor de P
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	2,0 \pm 0,6	2,1 \pm 0,7	0,7313
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	1,7 \pm 0,5	1,8 \pm 0,5	0,6490
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	2,2 \pm 0,8	2,8 \pm 0,5	0,0544
Brimonidina 0,2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	2,3 \pm 0,5	2,4 \pm 0,4	0,8621
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	2,3 \pm 0,4	2,1 \pm 0,6	0,2163
Solução controle ^{BAK 0,01%}	2,2 \pm 0,5	2,4 \pm 0,4	0,3466

*Os valores de P superiores à 0,05 não foram considerados significantes.

Teste lacrimal de Schirmer

A comparação da mensuração aquosa da lágrima pelo teste lacrimal de Schirmer (TLS) tipo 1, antes e após o tratamento não demonstrou alteração significativa em nenhum dos grupos avaliados ($P > 0,05$). Os valores para o TLS (média \pm DP) com os respectivos valores de P podem ser visualizados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Valores do teste lacrimal de Schirmer (TLS) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média \pm DP em milímetros, durante o intervalo de 1 minuto.

Drogas	TLS antes do tratamento (mm)	TLS após o tratamento (mm)	Valor de <i>P</i>
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	4,8 ± 0,9	4,4 ± 0,7	0,2878
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	6,3 ± 1,3	6,1 ± 1,4	0,7287
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	4,5 ± 0,7	5,2 ± 0,8	0,0511
Brimonidina 0,2% + M.de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	5,6 ± 1,6	5,3 ± 1,1	0,6795
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	5,1 ± 1,4	5,7 ± 1,3	0,3349
Solução controle ^{BAK 0,01%}	6,4 ± 1,1	6,6 ± 1,0	0,5716

*Os valores de *P* superiores à 0,05 não foram considerados significantes.

Pressão intra-ocular

A comparação da mensuração da pressão intraocular (PIO) antes e após o tratamento demonstrou alteração significativa em todos os grupos tratados com APG, exceto para a solução controle^{BAK}, que continha apenas o veículo com o conservante. Os valores da PIO (média ± DP) com os respectivos valores de *P* podem ser visualizados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Valores da pressão intra-ocular (PIO) mensurados nos coelhos da raça Nova Zelândia antes e após os tratamentos, de acordo com as drogas testadas, expressos em média ± DP.

Drogas	PIO antes do tratamento (mmHg)	PIO após o tratamento (mmHg)	Valor de <i>P</i>
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	13,3 ± 1,4	11,4 ± 2,0	0,0229*
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	12,3 ± 1,6	10,7 ± 1,5	0,0312*
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	13,9 ± 1,0	12,2 ± 0,9	0,0009*
Brimonidina 0,2% + M.de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	13,1 ± 0,9	11,4 ± 1,2	0,0034*
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	12,7 ± 1,9	11,1 ± 1,2	0,0363*
Solução controle ^{BAK 0,01%}	13,2 ± 0,4	13,0 ± 1,9	0,8220

*Os valores de *P* inferiores à 0.05 foram considerados significantes.

Análise histomorfométrica e imuno-histoquímica

Densidade das células caliciformes

A comparação do número de células calciformes entre os olhos tratados (esquerdo) e controle (direito) após 30 dias de tratamento contínuos não demonstraram alteração em nenhuma das drogas testadas. A contagem da quantidade de células calciformes (média \pm DP) com os respectivos valores de *P* podem ser visualizados na Tabela 4.5.

As fotomicrografias representativas do aumento do número de células calciformes da conjuntiva dos olhos tratados e não-tratados podem ser visualizadas na Figura 4.1.

Tabela 4.5 – Comparação da densidade de células calciformes (média \pm DP) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas.

Drogas	OD	OS	Valor de <i>P</i>
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	11,6 \pm 1,265	12,3 \pm 1,567	0,2862
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	12,3 \pm 2,710	13,0 \pm 3,367	0,6147
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	10,5 \pm 2,838	10,7 \pm 2,058	0,8588
Brimonidina 0,2% + M.de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	10,0 \pm 2,667	11,4 \pm 3,134	0,2962
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	12,1 \pm 2,514	11,6 \pm 2,633	0,6692
Solução controle ^{BAK 0,01%}	11,2 \pm 2,168	13,8 \pm 5,119	0,3262

*Os valores de *P* superiores à 0,05 não foram considerados significantes.

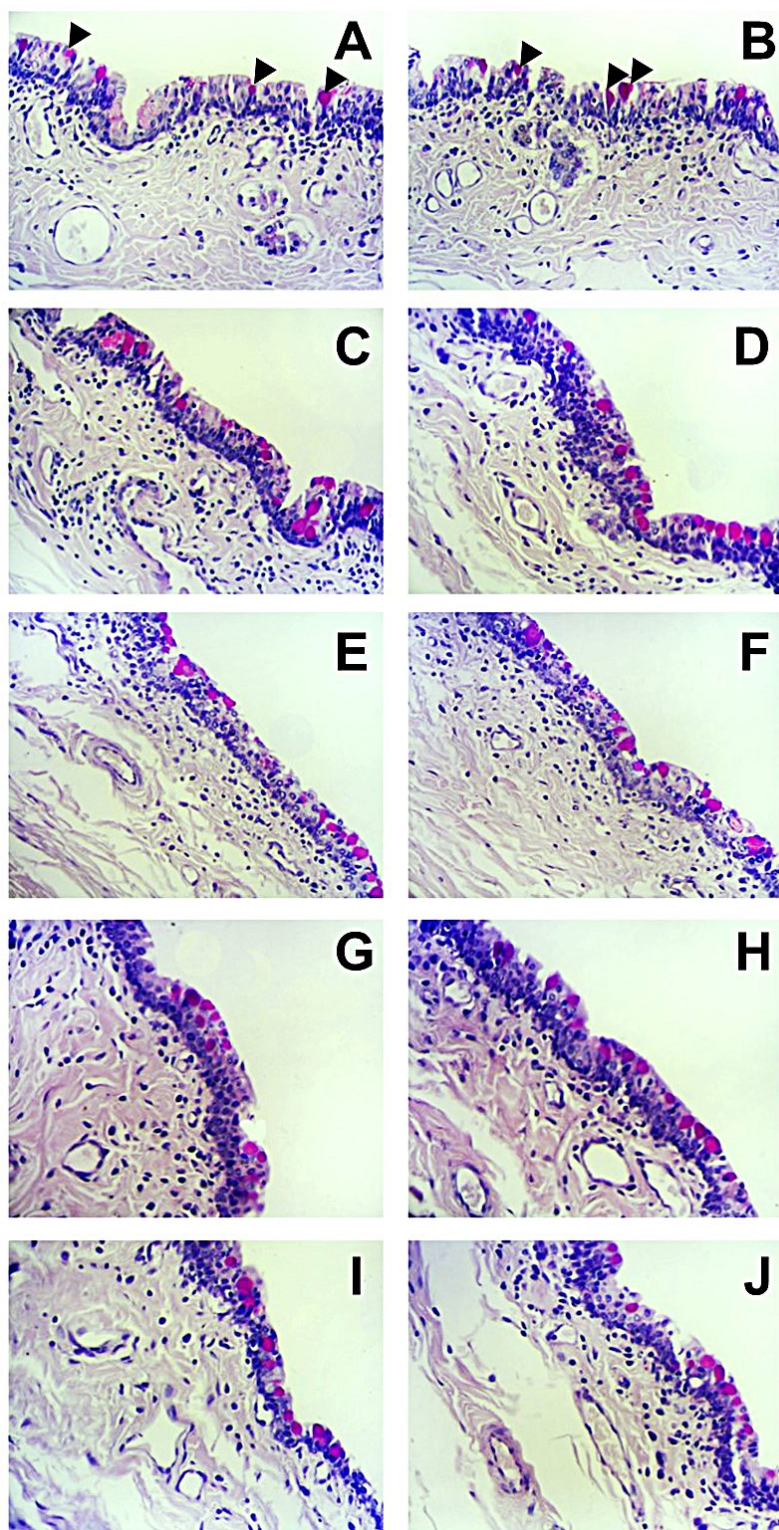


Figura 4.1 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (200x) coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). A densidade de células caliciformes (cabeça de seta preta) foram semelhantes nos olhos esquerdos tratados (B,D,F,H,J,M) aos olhos direito não-tratados (A,C,E,G,I,L). A e B se referem à dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D à dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}. E e F à brinzolamida 1% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. G e H à brimonidina 0,2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. I e J à solução controle^{BAK}.

Espessura da parede vascular

A espessura da parede vascular (EPV) do tecido conjuntival foi comparada entre os olhos tratados (esquerdo) e controle (direito), após 30 dias de tratamento contínuos, não demonstrando alteração para nenhuma das drogas testadas. Os valores da EPV (média \pm DP) com os respectivos valores de *P* podem ser visualizados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Comparação da espessura da parede vascular (EPV) entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em μm .

Drogas	EPV do OD (μm)	EPV do OE (μm)	Valor de <i>P</i>
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	4,279 \pm 0,847	4,228 \pm 0,932	0,8997
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	4,021 \pm 0,815	4,598 \pm 1,069	0,1913
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	4,406 \pm 0,758	4,427 \pm 0,828	0,9525
Brimonidina 0,2% + M.de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	4,643 \pm 0,721	4,557 \pm 0,755	0,7974
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	4,353 \pm 1,006	4,169 \pm 0,928	0,6762
Solução controle ^{BAK 0,01%}	4,804 \pm 1,232	4,554 \pm 1,184	0,7522

*Os valores de *P* superiores à 0,05 não foram considerados significantes.

A análise imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de macrófagos reativos (anti-RAM11) comparada entre os olhos esquerdo (tratados) e direito (controles), após 30 dias de tratamento demonstrou um aumento da resposta ao anticorpo RAM11 nos olhos tratados para todas as drogas, exceto para dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE} (Tabela 4.7). A resposta IHQ anti-RAM11 pode ser melhor avaliada na Figura 4.2.

Table 4.7 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-RAM11 entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias

consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em somatório de áreas em μm^2 .

Drogas	RAM11 no OD (μm^2)	RAM11 no OS (μm^2)	Valor de <i>P</i>
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	633,981 \pm 229,532	1207,866 \pm 385,829	0,0008*
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	263,966 \pm 173,984	642,484 \pm 601,322	0,0719
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	618,203 \pm 262,670	1460,454 \pm 725,052	0,0028*
Brimonidina 0,2% + M.de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	624,797 \pm 243,333	1418,755 \pm 467,904	0,0002*
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	1564,251 \pm 508,218	2517,6 \pm 1028,104	0,0170*
Solução controle ^{BAK 0,01%}	1250,832 \pm 297,694	7460,292 \pm 2253,231	0,0003*

*Os valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados significantes.

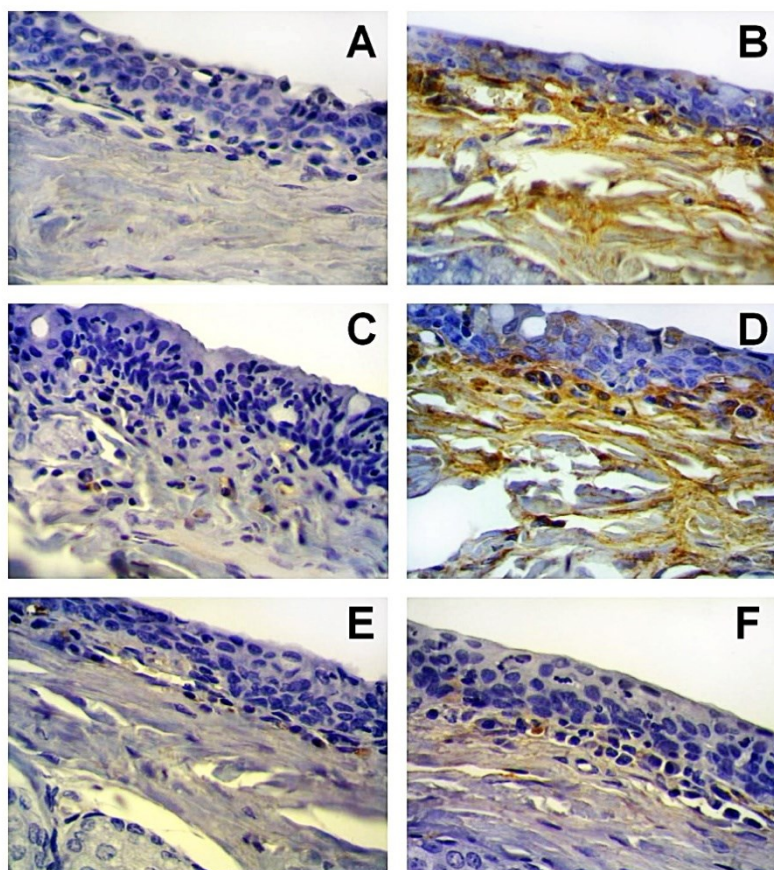


Figura 4.2 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-RAM11. A e B se referem à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D solução controle^{BAK}. E e F à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foram mais intensas nos olhos esquerdos (B, D) do que nos olhos direitos (A, C), em contraste com a contracoloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença em (E e F).

A resposta da conjuntiva ao anticorpo anti-CD45RO, para detecção de linfócitos reativos, foi comparada entre os olhos esquerdo (tratados) e direito (controles), após 30 dias de tratamento. Os olhos tratados com dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK0,0075%} apresentaram aumento da resposta ao anticorpo CD45RO quando comparados aos olhos controle. Não foi observada diferença significativa entre os olhos esquerdo e direito tratados com as demais drogas e solução controle^{BAK} (Tabela 4.8). A resposta anti-CD45RO pode ser melhor visualizada na Figura 4.3.

Tabela 4.8 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-CD45RO entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média ± DP) expressos em somatório de áreas em μm^2 .

Drogas	CD45RO no OD (μm^2)	CD45RO no OS (μm^2)	Valor de <i>P</i>
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	351,594 ± 237,079	654,758 ± 337,314	0,0320*
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	370,094 ± 347,154	598,324 ± 272,577	0,1194
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	34,738 ± 19,066	48,35 ± 25,278	0,1908
Brimonidina 0,2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	306,179 ± 181,713	486,926 ± 276,919	0,1015
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	316,198 ± 206,693	418,958 ± 198,714	0,2719
Solução controle ^{BAK 0,01%}	102,088 ± 63,088	125,239 ± 65,27	0,5842

*Os valores de *P* inferiores à 0,05 foram considerados significantes.

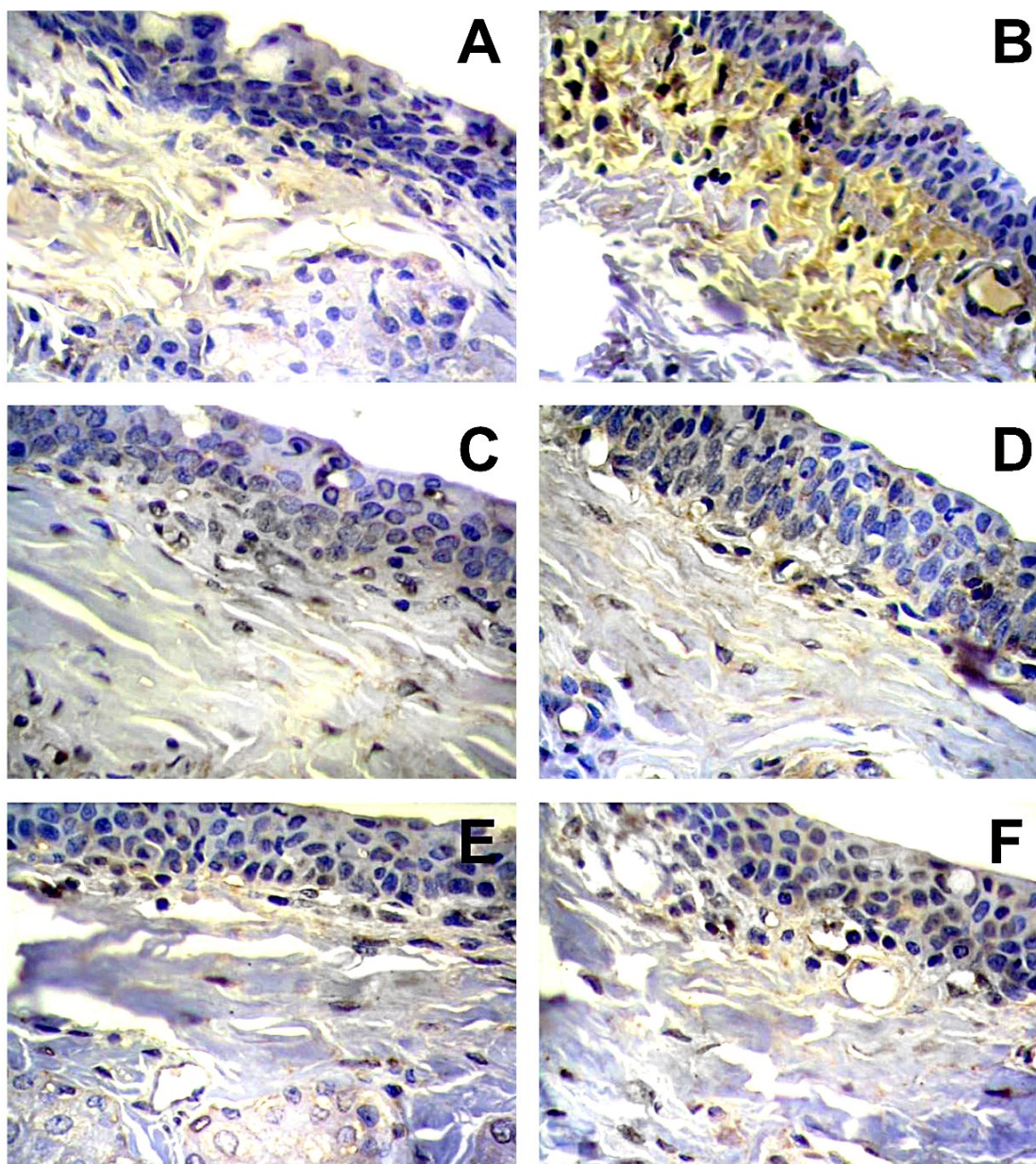


Figura 4.3 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-CD45RO. A e B se referem à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}. E e F à solução controle^{BAK}. Observe que a densidade da resposta imune (áreas castanhas) foi maior no olho esquerdo tratado (B) que no olho direito não-tradado (A), em contraste com a contracoloração de eosina (áreas azuis), não apresentando diferença entre (C e D) e (E e F).

A resposta da conjuntiva ao anticorpo anti-VCAM, para detecção de inflamação do endotélio vascular, foi comparada entre os olhos esquerdo (tratados) e direito (controles), após 30 dias de tratamento. Nenhum dos olhos tratados com as diferentes drogas apresentaram alteração da resposta ao

anticorpo quando comparados aos olhos controle (Tabela 4.9). A resposta anti-VCAM pode ser melhor visualizada na Figura 4.4.

Tabela 4.9 – Comparação das áreas reativas para o anticorpo anti-VCAM entre os olhos esquerdo (OS) tratados e olhos direito (OD) não tratados, após 30 dias consecutivos de tratamento nos coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com as drogas testadas. Valores (média \pm DP) expressos em somatório de áreas em μm^2 .

Drogas	VCAM no OD (μm^2)	VCAM no OS (μm^2)	Valor de <i>P</i>
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,0075%}	347,451 \pm 246,418	545,816 \pm 265,014	0,1001
Dorzolamida 2% + M. de timolol 0,5% ^{BAKFREE}	246,686 \pm 183,916	450,35 \pm 160,442	0,2482
Brinzolamida 1% + M. de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	175,444 \pm 127,699	261,106 \pm 180,328	0,2360
Brimonidina 0,2% + M.de timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	619,007 \pm 463,714	933,467 \pm 818,428	0,3044
Maleato de Timolol 0,5% ^{BAK 0,005%}	242,631 \pm 158,681	255,527 \pm 151,796	0,8548
Solução controle ^{BAK 0,01%}	393,866 \pm 231,270	467,414 \pm 244,763	0,6384

*Os valores de *P* superiores à 0,05 não foram considerados significantes.

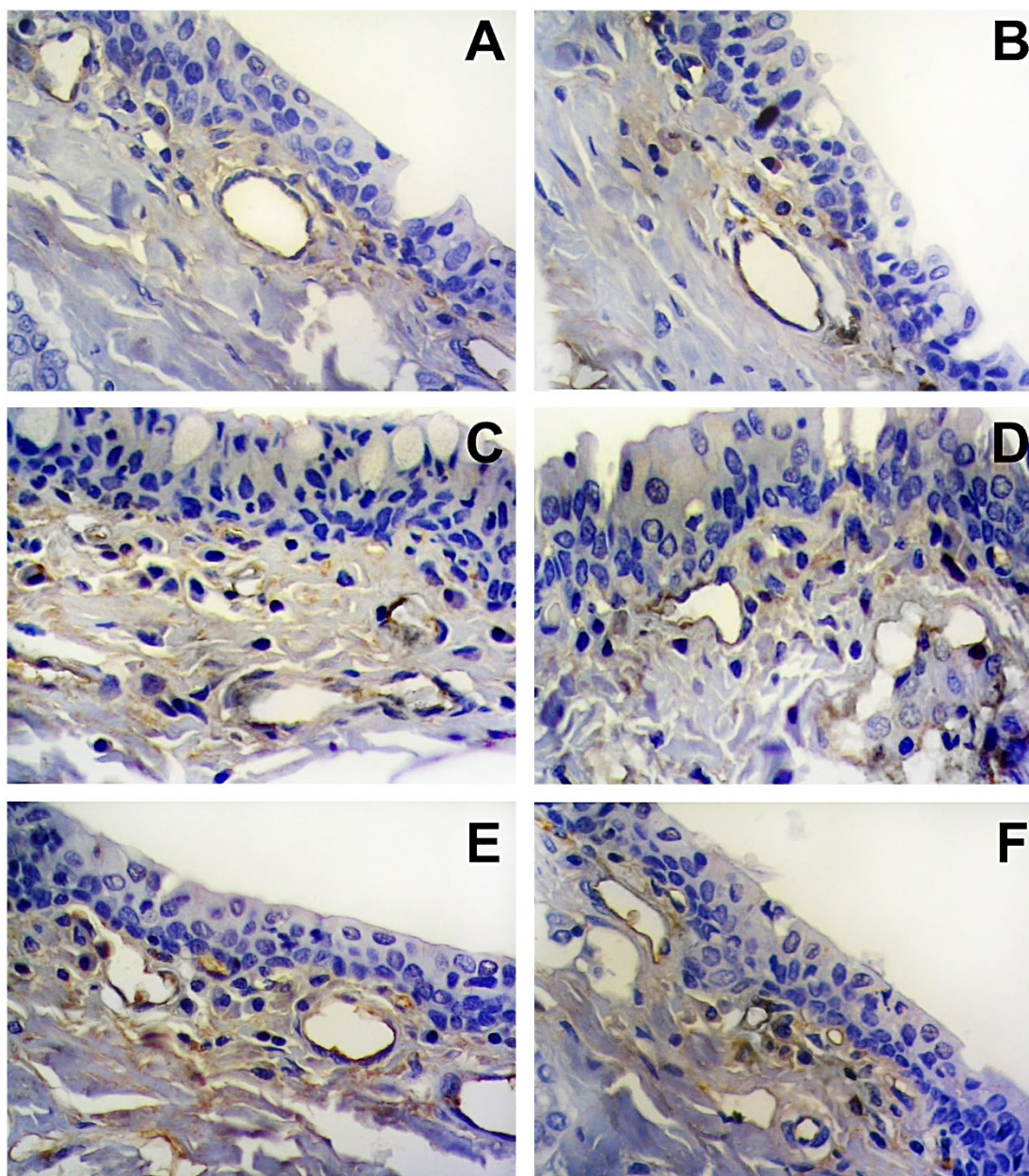


Figura 4.4 – Fotomicrografias da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia (400x) após 30 dias de tratamento, corados com anticorpo anti-VCAM. A e B se referem à associação dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. C e D à brinzolamida 1% + maleato de timolol 0,5%^{BAK}. E e F à solução controle^{BAK}. Não é possível diferenciar a densidade da resposta imune (áreas castanhas em contraste com a contracoloração de eosina - azul) dos olhos tratados (B, D e F) em relação aos não tratados (A, C e E).

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a terapia tópica com drogas beta bloqueadoras, inibidores de anidrase carbônica, alfa-agonistas e combinações fixas de ambos, comumente utilizadas em pacientes com glaucoma, podem induzir alterações morfológicas importantes na superfície ocular de coelhos saudáveis por meio da modificação do padrão celular normal. Entre os principais agentes causadores de reações adversas na superfície ocular está o conservante cloreto de benzalcônio (BAK), utilizado para aumentar a permeabilidade das drogas sobre a conjuntiva e para prevenir o crescimento bacteriano nas formulações oftálmicas.^{21,22,23}

Sabe-se que os conservantes não são os únicos agentes envolvidos no desenvolvimento de alterações da superfície ocular, durante a terapia prolongada com drogas antiglaucomatosas. As próprias drogas em si, podem resultar em alterações pelo seu efeito cumulativo, de acordo com a frequência e duração do tratamento.^{23,24} Um exemplo disso foi a recente descoberta de que o maleato de timolol 0,5% apresenta propriedades que podem interferir no crescimento de hemangiomas em crianças.²⁵

A literatura sugere que o uso do maleato de timolol possa resultar em diminuição da SC em pessoas idosas tratadas com esta terapia,²⁶ e que a presença do conservante BAK seja o fator crucial na modificação da resposta neurológica fisiológica da córnea de coelhos.²⁷ Avaliação dos testes oftálmicos em nosso estudo não resultou em variação na sensibilidade da córnea (SC) ou teste lacrimal de Schirmer (TLS) durante o tratamento para nenhuma das drogas testadas. Uma limitação da análise da SC pela estesiometria, talvez seria que, o resultado observado sofre variação intra e inter-individual considerável na interpretação dos resultados, o que poderia dificultar a comparação entre diferentes estudos realizados por diferentes pesquisadores.²⁸ Por sua vez, a alteração do TLS, que é frequentemente observada em drogas associadas ao conservante BAK,^{2,29,30} e que não foi observada em nenhuma das drogas de nossa pesquisa, poderia ser explicada pelo curto período de tratamento, em nosso estudo, que não resultou em modificações da superfície ocular tão expressivas ao ponto de alterar produção lacrimal. Frezzotti et al (2014) observou alterações importantes na superfície ocular de pacientes tratados com maleato de timolol^{BAK} em relação ao maleato de timolol^{BAKFREE}, demonstrando

redução da produção lacrimal, porém seu estudo foi realizado durante um ano de tratamento.³¹

Considerando a absorção conjuntival e ocular das drogas instiladas topicamente, é esperado que os olhos tratados com drogas antiglaucomatosas apresentem uma redução na PIO.³²⁻³⁵ A redução PIO observada todos os olhos dos coelhos tratados com as formulações antiglaucomatosas, exceto para a solução controle^{BAK} foi semelhante à observada em coelhos, relatada pela literatura.²⁰

A manutenção da estabilidade do filme lacrimal é dependente da presença e viabilidade das células caliciformes na conjuntiva.³⁶ A redução do número de células caliciformes esteve relacionada ao desenvolvimento de processos inflamatórios na conjuntiva.^{37,38} A redução do número de células caliciformes após o uso de terapias antiglaucomatosas, tanto a curto quanto a longo prazo de tratamento, também esteve relacionada à presença do conservante BAK nestas formulações.^{14,21,39} Em nossa pesquisa, o número de células caliciformes não apresentou alteração significativa após os 30 dias de tratamento para nenhuma das drogas testadas, o que por sua vez pode sugerir relativa segurança para o uso durante este período de tempo. Um período mais prolongado de tempo se faz necessário para concluir se a presença do conservante na formulação, como exemplo na associação dorzolamida com maleato de timolol associada^{BAK} e a associação^{BAKFREE} do mesmo produto apresentariam diferença entre elas, como observado em outras pesquisas.^{23,24,40}

A ausência de alteração na EPV dos capilares da conjuntiva dos coelhos tratados, que é comumente observada na inflamação crônica,^{41,42} não foi expressiva para nenhuma das drogas testadas, fazendo-nos crer que o uso destas formulações oftálmicas não interfere de forma direta para a inflamação vascular durante as condições do estudo. Durante a inflamação vascular, ocorre a ativação de moléculas de adesão celular no endotélio dos vasos,⁴³ que por sua vez contribui para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de linfócitos, monócitos basófilos e eosinófilos. A detecção imuno-histoquímica de moléculas de adesão celular (VCAM-1) também não foi expressiva em nenhum dos olhos tratados, corroborando a hipótese que os tratamentos não resultaram em alterações vasculares. Entretanto, a longo prazo, é descrito que o tratamento com drogas livres de conservante promovem menos alterações vasculares

doque àquelas associadas ao BAK.⁴⁰ Russ *et al* (2007) observaram resposta vascular mais evidente na conjuntiva de coelhos tratados com durante 30 dias com drogas análogas de prostaglandina,¹⁵ porém o mecanismo de ação destas drogas é diferente, e nesta pesquisa não foi realizada busca para detecção específica de moléculas de adesão celular (VCAM-1).

Estudos histológicos e de citologia de impressão da conjuntiva de pessoas demonstraram que os olhos de pacientes tratados com drogas antiglaucomatosas aumentam a resposta celular à inflamação.⁴⁴⁻⁴⁷ A fase inicial da inflamação foi caracterizada por resposta que cursa com vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, edema, e é seguida pela fase tardia com infiltração de células inflamatórias, especialmente linfócitos e macrófagos.^{48,49}

O aumento da resposta à inflamação mediada por macrófagos reativos na conjuntiva dos coelhos tratados com as drogas associadas ao conservante BAK e a ausência de resposta para a associação dorzolamida com maleato de timolol^{BAKFREE}, sugerem que a presença do BAK pode ter sido responsável pelo aumento da resposta macrófágica (anti-RAM11). Acreditamos que o conservante BAK presente nestas formulações, mesmo em concentrações variadas em cada droga, foi o responsável por promover parte da inflamação da conjuntiva, devido ao seu efeito citotóxico local e talvez por exercer ação direta sobre os próprios macrófagos. Estudo recente, realizado *in vitro*, indica que o BAK pode apresentar efeito direto sobre os macrófagos, capaz de estimular aumento da fagocitose e liberação de citocinas.⁵⁰ Este trabalho concluiu que a exposição prolongada ao BAK, mesmo em baixas concentrações, durante a terapia crônica foi considerado fator estimulante responsável pela ativação de macrófagos na inflamação.⁵⁰

Uma comparação entre a resposta inflamação da conjuntiva de pessoas tratadas com drogas antiglaucomatosas por períodos prolongados e pessoas saudáveis sem tratamento demonstrou aumento do número de linfócitos-T e linfócitos-T de memória nos pacientes que receberam tratamento.⁵¹

A estimulação de linfócitos-T reativos (resposta anti-CD45RO) detectada na conjuntiva dos coelhos tratados com dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAK 0,0075%}, em comparação com a ausência de resposta do grupo tratado com dorzolamida 2% + maleato de timolol 0,5%^{BAKFREE}, demonstra que presença do BAK nesta formulação participou ativamente, influenciando na resposta

linfocitária. A resposta da estimulação, talvez não se dê apenas pela elevada concentração de BAK^{0,0075%} neste produto, mas também possa ser possível que a mistura das drogas exerça, de forma sinérgica associada ao BAK uma estimulação de linfócitos-T reativos. Cho, 2011, compararam a citotoxicidade do tratamento concomitante do maleato de timolol^{BAK} e da dorzolamida^{BAK} versus o tratamento da combinação fixa dorzolamida + maleato de timolol^{BAK}, e perceberam que a combinação fixa possui maior efeito citotóxico do que o uso concomitante das drogas individualmente.⁵² Porém concluíram que, a longo prazo, o efeito cumulativo do uso de duas soluções individuais com conservante BAK sobre a superfície ocular pode induzir maior alteração do que o uso da combinação fixa,²³ ressaltando o efeito citotóxico das próprias drogas, no entanto com menor intensidade que o efeito cumulativo do BAK. Russ et al (2007) observaram a presença de infiltrado inflamatório moderado na conjuntiva de coelhos após o tratamento com maleato de timolol,¹⁵ entretanto sem alterações patológicas importantes do estroma conjuntival. Galletti et al (2013) constataram efeitos citotóxicos do BAK sobre o epitélio da superfície ocular concluindo que este conservante pode interferir na resposta imune da conjuntiva.⁵³

O uso de betabloqueadores, APG durante 30 dias de tratamento resultou em alterações inflamatórias na conjuntiva de coelhos, apresentando resposta mais deletéria da inflamação quando a droga esteve associada ao conservante BAK, do que quando este não estava presente. Ao que tudo indica, portanto, a drogas antiglaucomatosas sem a adição de conservantes são menos agressivas à superfície ocular.

Todavia, como sugestão de pesquisas futuras, um tratamento experimental mais longo com drogas com e sem conservantes poderia fornecer mais informações sobre a intensidade das lesões avaliadas neste estudo.

Agradecimentos

Este trabalho foi inteiramente financiado pela Merck Sharp & Dohme (MSD, França). Gostaríamos de agradecer ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná - HVUFPR, por oferecer a estrutura para o desenvolvimento deste estudo, bem como um auxílio dos estudantes, funcionários e professores envolvidos na pesquisa. Um agradecimento especial ao Laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, pelo auxílio no

desenvolvimento do material histopatológico e imuno-histoquímico e por fornecer o local e estrutura para avaliação e análise das lâminas.

4.5 REFERÊNCIAS

1. Dautriche CN, Xie Y, Sharfstein ST (2014) Walking through trabecular meshwork biology: Toward engineering design of outflow physiology. *Biotechnology Advances* 2014; 14: 1-13.
2. Dubielzig RR. The Glaucoma. In: Dubielzig RR, Ketring KL, McLellan GJ, Albert DM. *Veterinary ocular pathology: a comparative review*. New York: Elsevier. 1.ed. 2010: 7; 419-448.
3. Servat JJ, Bernardino CR (2011) Effects of common topical antiglaucoma medications on the ocular surface, eyelids and periorbital tissue. *Drugs Aging* 28: 267–282.
4. Lester M, Telani S, Frezzotti P, Motolese I, Figus M, Fogagnolo P, Perdicchi A. (2014) Ocular Surface Changes in Glaucomatous Patients Treated With and Without Preservatives Beta-Blockers. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. DOI: 10.1089/jop.2013.0216
5. Rummenie VT, Matsumoto Y, Dogru M, et al (2008) Tear cytokine and ocular surface alterations following brief passive cigarette smoke exposure. *Cytokine* 43: 200–208.
6. Tarabishy AB, Jeng BH (2008) Bacterial conjunctivitis: a review for internists. *Cleve Clin J Med* 75: 507–512.
7. Ueta M, Kinoshita S (2010) Ocular surface inflammation mediated by innate immunity. *Eye Contact Lens* 36: 269–281.
8. Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A, Zeyen T (2007) Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *European Journal of Ophthalmology* 17: 341-349.
9. Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D, Hamard P, Hreiche R, et al. (2005) CCR 4 and CCR 5 expression in conjunctival specimens as differential markers of T(H)1/T(H)2 in ocular surface disorders. *J Allergy Clin Immunol* 116: 614–619.
10. Baudouin C, Liang H, Hamard P, Riancho L, Creuzot-Garcher C, et al. (2008) The ocular surface of glaucoma patients treated over the long term expresses inflammatory markers related to both T-helper 1 and T-helper 2 pathways. *Ophthalmology* 115: 109–115.
11. Martone G, Frezzotti P, Tosi GM, Traversi C, Mittica V, et al. (2009) An in vivo confocal microscopy analysis of effects of topical antiglaucoma therapy

- with preservative on corneal innervation and morphology. *Am J Ophthalmol* 147: 725–735.
12. Ammar 2011, Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell PA (2009) Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 25:113–119.
 13. Mastropasqua L, Agnifili L, Fasanella V, Curcio C, Ciabattoni C, Mastropasqua R, Toto L, Ciancaglini M (2013) Conjunctival goblet cells density and preservative-free tafluprost therapy for glaucoma: an in vivo confocal microscopy and impression cytology study. *Acta Ophthalmol* 91: e397–e405.
 14. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, et al. (2004) Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1360–1368.
 15. Russ HH, Costa VP, Ferreira FM et al. (2007) Conjunctival changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate: a histomorphometric study. *Arq Bras Oftalmol* 70: 910–916.
 16. Faria NVL, Russ HH, Rose P, Noronha L, Mello PA, Montiani-Ferreira F, Sobrinho SC (2013) Conjunctival changes and inflammatory aspects in rabbits' conjunctivas induced by fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol maleate. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection* 3: 22.
 17. Kozobolis VP, Detorakis ET, Maskaleris G, Koukoula SC, Fountoulakis N, Chrysochoou F, Konstas AG (2005) Corneal sensitivity changes following the instillation of latanoprost, bimatoprost, and travoprost eyedrops. *Am J Ophthalmol* 139: 742–743.
 18. Thygesen J, Aaen K, Theodorsen F, Kessing SV, Prause JU (2000) Short-term effect of latanoprost and timolol eyedrops on tear fluid and the ocular surface in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Acta Ophthalmol Scand* 78: 37–44.
 19. Terai N, Müller-Holz M, Spoerl E, Pillunat LE (2011) Short-term effect of topical antiglaucoma medication on tear-film stability, tear secretion, and corneal sensitivity in healthy subjects. *Clin Ophthalmol* 5: 517–525.
 20. Wang X, Dong J, Wu Q (2013) Twenty-four-hour measurement of IOP in rabbits using rebound tonometer. *Vet Ophthalmol*. 2013 Jan 1. doi: 10.1111/vop.12020. [Epub ahead of print]
 21. Nenciu A, Stefan C, Ardelean C (2004) Structural and immunohistochemical changes of conjunctiva induced by topical glaucoma medication. *Oftalmologia*. 48: 35–42.

22. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F (2005) In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Visual Science*. 46: 4594-4599.
23. Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y (2012) Comparative study of in vitro ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol maleate 1% dorzolamide eyedrop and its components with 0,005% benzalconium chloride. *Biocontrol Science*. 17:115-120.
24. Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R (2004) Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea*. 23: 490-496.
25. Moehrle M, Léauté-Labrèze C, Schimidt V, et al. (2013) Topical timolol for small hemangiomas of infancy. *Pediatric Dermatology*. 30: 245-249.
26. Weissman SS, Asbell PA (1990) Effects of topical timolol (0.5%) and betaxolol (0.5%) on corneal sensitivity. *The British Journal of Ophthalmology*. 74: 409-412.
27. Chen W, Zhang Z, Hu J, et al. (2013) Changes in rabbit corneal innervation induced by the topical application of benzalkonium chloride. *Cornea*. 32: 1599-1606.
28. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, Gain P (2007) Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 48: 2062-2067.
29. Sarkar J, Chaudhary S, Namavari A, et al. (2012) Corneal neurotoxicity due to topical benzalkonium chloride. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 53: 1792-1802.
30. Lester M, Telani S, Frezzotti P, et al (2004) Ocular Surface Changes in Glaucomatous Patients Treated With and Without Preservatives Beta-Blockers. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. DOI: 10.1089/jop.2013.0216
31. Frezzotti P, Fogagnolo P, Haka G, et al. (2014) In vivo confocal microscopy of conjunctiva in preservative-free timolol 0.1% gel formulation therapy for glaucoma. *Acta Ophthalmologica*. 92: 133-140.
32. Hoyng PF, van Beek LM (2000) Pharmacological therapy for glaucoma: a review. *Drugs*. 59: 411-434.
33. Fiscella RG (2002) Glaucoma medications: a drug-therapy review. *Manag Care*. 11: 25-31.

34. Marquis RE, Whitson JT (2005) Management of glaucoma: focus on pharmacological therapy. *Drugs Aging* 22: 1-21.
35. Katz LJ, Simmons ST, Craven ER (2007) Efficacy and safety of brimonidine and dorzolamide for intraocular pressure lowering in glaucoma and ocularhypertension. *Curr Med Res Opin* 23: 2971-2983.
36. Doughty MJ & Bergmanson JPG (2003) New insights into surface cells and glands of the conjunctiva and their relevance to the tear film. *Optometry* 74: 485–500.
37. Arici MK, Arici DS, Topalkara A, Güler C (2000) Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol* 28: 113-7.
38. Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M & Milazzo G (2002) Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br J Ophthalmol* 86: 181–184.
39. Herreras JM, Pastor JC, Calonge M et al. (1992) Ocular surface alteration after longterm treatment with an antiglaucomatous drug. *Ophthalmology* 99: 1082–1088.
40. Rosin LM, Bell NP (2013) Preservative toxicity in glaucoma medication: clinical evaluation of benzalkonium chloride-free 0.5% timolol eye drops. *Clinical Ophthalmology*. 7: 2131-2135.
41. Burton AC (1954) Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *The American Physiological Society* 34: 619-642.
42. Moore SA, Bohlen HG, Miller BG, Evan AP (1985) Cellular and vessel wall morphology of cerebral cortical arterioles after short-term diabetes in adult rats. *Blood Vessels* 22: 265-277.
43. Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky ML, Langille BL (1995) Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15: 2-10.
44. Brandt JD, Wittpen JR, Katz LJ et al. (1991) Conjunctival impression cytology in patients with glaucoma using long term topical medication. *Am. J. Ophthalmol* 112: 297–301.
45. Mietz H, Niesen U, Krieglstein GK (1994) The effect of preservatives and antiglaucomatous medication on the histopathology of the conjunctiva. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 232, 561–565.
46. Becquet F, Goldschild M, Moldovan MS et al. (1998) Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface. *Curr. Eye Res* 17: 419–425.

47. Moreno M, Villena A, Cabarga C et al. (2003) Impression cytology of the conjunctival epithelium after anti-glaucomatous treatment with latanoprost. *Eur J Ophthalmol* 13: 553–559.
48. Niederkorn JY (2008) Immune regulatory mechanisms in allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 472–476.
49. Liang H, Baudouin C, Labbe A, Riancho L, Brignole-Baudouin F (2008) Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue (CALT) Reactions to Antiglaucoma Prostaglandins with or without BAK-Preservative in Rabbit Acute Toxicity Study. *Plos One*. 2012; 7: 1-9.
50. Michée S, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Rostene W, Baudouin C, Labbé A (2013) Effects of benzalkonium chloride on thp-1 differentiated macrophages in vitro. *Plos One* 8: e72459.
51. Helin M, Rönkkö S, Puustjärvi T, Teräsvirta M, Ollikainen M, Uusitalo H (2011) Conjunctival inflammatory cells and their predictive role for deep sclerectomy in primary open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma. *J Glaucoma* 20: 172-178.
52. Cho HK, Park MH, Moon JI (2011) Effects of antiglaucoma drugs on the ocular surface in rabbits: a fixed-combination drug versus two concomitant drugs. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 55: 670-675.
53. Galletti JG, Gabelloni ML, Morande PE, Sabbione F, Vermeulen ME, Trevani AS, Giordano MN (2013) Benzalkonium chloride breaks down conjunctival immunological tolerance in a murine model. *Mucosal Immunology* 6, 24–34.

5. ANEXOS



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

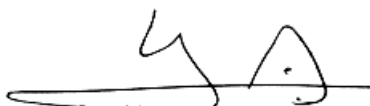
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 011/2011, referente ao projeto “Avaliação das alterações da conjuntiva de coelhos da raça Nova Zelândia submetidos ao tratamento com análogos da prostaglandina, combinações antiglaucomatosas e combinações antiglaucomatosas livre de preservativo: um estudo imunohistoquímico e histomorfométrico”, sob a responsabilidade de Leandro Lima, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 29 de junho de 2011.


CERTIFICATE

We certify that the protocol number 011/2011, regarding the project “Corneal Sensibility and healing”, in charge of Leandro Lima, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on June, 2011.

Curitiba, 29 de junho de 2011.



Geraldo Camilo Alberton
 Presidente



Patrick Schmidt
 Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

Evaluation of standardized endodontic paper point tear test in New Zealand white rabbits and comparison between corneal sensitivity followed tear tests

Leandro Lima,* Rogério Ribas Lange,* Amália Turner-Giannico† and Fabiano Montiani-Ferreira*‡

*Veterinary Medicine Department, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, 80035-050, Curitiba, PR, Brazil; †Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, 80030420, Curitiba, Paraná, Brazil; and ‡Small Animal Clinical Sciences, Michigan State University, D-208 Veterinary Medical Center, East Lansing, 48824-1314, MI, USA

Address communications to:

F. Montiani-Ferreira

Tel.: +55 41 3350 5725

Fax: +55 41 3350 5725

e-mail: montiani@ufpr.br

Objective To evaluate endodontic paper point tear test (PPTT) in rabbits and compare changes in corneal touch threshold (CTT) induced by Schirmer tear test (STT) and PPTT. Normal corneal sensitivity recovery time after both tear tests was also measured. Also, mean PPTT and STT values were obtained.

Methods Tear production of 20 eyes, from 10 rabbits, was evaluated using STT and the PPTT. Central corneal touch threshold was measured by a Cochet-Bonnet esthesiometer before any tear test was performed (zero time), immediately after the test (1 min), and consecutively at 6, 11, 16, and 26 min. Tests were conducted on three consecutive days: Day 1 – control condition, no tear tests performed only the CTT; Day 2 – CTT before and after PPTT; and Day 3 – CTT before and after STT. CTT values were compared using repeated measures ANOVA.

Results Corneal touch threshold was significantly increased for at least 16 min after STT, indicating STT causes corneal discomfort. No difference was found between CTT following PPTT and controls, indicating PPTT caused minimal corneal discomfort. The mean (\pm SD) value for STT was 5.2 ± 1.0 mm/min and for PPTT was 13.8 ± 1.5 mm/min.

Discussion The aqueous fraction of rabbit's tears can be successfully measured by PPTT. This report established reference values for PPTT in rabbits. Additionally, the absence of a significant difference in CTT after PPTT compared with controls shows that PPTT is well tolerated by rabbits. Considering the improved comfort (compared with STT), accuracy, and low cost, PPTT is a bona fide method of measuring aqueous tear production in rabbits.

Key Words: corneal touch threshold, endodontic paper point tear test, rabbits, Schirmer tear test, tear production

INTRODUCTION

Several corneal and conjunctival diseases are associated with lower lacrimation, poor lubrication, or alteration in the tear film quality, the diagnosis of which often involves measuring aqueous tear production.^{1–3} Therefore, there is considerable interest between veterinary ophthalmologists to find alternative ways to measure tear production in animals, especially exotic and laboratory animals in which the standard Schirmer tear test (STT) is difficult to perform.

Evaluation of aqueous tear production is an important part of the ophthalmic examination, which is especially useful to diagnose keratoconjunctivitis sicca.³ There are

different tests used to measure the tear production such as Schirmer tear test (STT),^{4,5} modified Schirmer tear test (mSST),⁶ phenol red cotton thread tear test (PRTT),^{7–11} and recently developed paper point tear test (PPTT).^{10,11} The choice of each test depends on eye size and the animal species being evaluated.

Schirmer tear test is the most common test used around the world, and established normal values have been reported for humans¹² and several species including dogs,^{4,13} cats,¹⁴ horses,¹⁵ chinchillas,⁵ ferrets,¹⁶ capybaras,¹⁷ monkeys,^{18,19} pigs,²⁰ and rabbits.²¹ In our experience, animal patients commonly exhibit mild-to-moderate ocular discomfort when an STT is being performed evidenced by blepharospasm.

Clinical and histologic comparison of conjunctival changes induced by antiglaucoma prostaglandin analogs with and without preservatives

Abstract

Background: The objective of this research was to evaluate and compare clinical tests, histological and immunohistochemical changes induced by prostaglandin analogues (PGAs) containing benzalkonium chloride (BAK), polyquaternium-1 (PQ) and without preservatives (BAKFREE) in the conjunctiva of rabbits. A total of 60 rabbits (120 eyes), were divided into six groups, and treated during 30 days with: latanoprost^{BAK}, bimatoprost^{BAK}, travoprost^{BAK}, travoprost^{PQ}, tafluprost^{BAK/PRES} and control solution^{BAK}. Right eyes served as controls and received no medication. Corneal touch threshold (CTT), Schirmer tear test (STT) and intraocular pressure (IOP) were measured during pre and post treatment periods. Conjunctival goblet cells density and vascular endothelium thickness (VET) were evaluated. Immunohistochemistry was used to detect reactive macrophages (RAM11), vascular endothelial inflammation (VCAM-1), and reactive T-lymphocytes (CD45RO).

Results: No differences were observed concerning CTT and STT. IOP was reduced in all PGAs after treatment. An increased number of goblet cells were observed after treatment. VET were increased after treatment with travoprost^{BAK}, bimatoprost^{BAK}, and latanoprost^{BAK}. An increased macrophages response was observed after treatment with all BAK groups. Endothelial blood vessels inflammation were observed after treatment with travoprost^{BAK}. Reactive lymphocytes were increased after treatment with travoprost^{BAK}, bimatoprost^{BAK}, latanoprost^{BAK} and tafluprost^{BAK/PRES}.

Conclusion: Prostaglandin analogs appear to have a protective effect against BAK in goblet cells conjunctiva in short-term therapy, and drugs associated with preservative BAK may induce changes in rabbit's healthy conjunctiva, trends to increase macrophage and lymphocytic inflammatory response.

Keywords: Glaucoma therapy; Conjunctival inflammation, Benzalkonium chloride; Histomorphometric, Immunohistochemistry.

Background

According to the World Health Organization, glaucoma is the second leading cause of blindness worldwide (Dautriche, 2014). Medical therapy usually constitutes the first line treatment for glaucomatous patients. Patients often use topical therapy for many years, and may experience the occurrence of signs and

Proven cardiac changes during death-feigning (tonic immobility) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)

Amália Turner Giannico · Leandro Lima · Rogério Ribas Lange · Tilde Rodrigues Froes · Fabiano Montiani-Ferreira

Received: 2 July 2013 / Revised: 21 November 2013 / Accepted: 22 January 2014
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Tonic immobility (TI) is a response to fear or threat by remaining motionless, principally when attacked by predators from which there is no possibility of escape. Thus, here we demonstrate a way of easily reproducing this phenomenon in a laboratory setting and characterize the cardiac electromechanical alterations during TI. We observed a significant decrease in heart rate (HR) and changes of rhythm in electrocardiogram during TI in rabbits. Echocardiogram showed a significant increase in the left ventricle chamber diameter during systole and a consequent decrease in fractional shortening and ejection fraction, in addition to the HR and rhythm changes. There was also a significant decrease in aortic and pulmonary artery blood flow. Diastolic functional changes included a significant decrease of the peak atrial contraction velocity (A peak) and consequent increase in the ratio of peak early diastolic velocity to A peak and increased isovolumetric relaxation time. We were able to prove that TI changes the cardiac function considerably. Although the “fight-or-flight” response is the most common response to fear, which is characterized by the action of sympathetic nervous system with tachycardia and increased physical activity, TI is an alternative anti-predator behavior causing cardiac changes opposite to the “fight-or-flight” phenomenon.

Keywords Cardiology · Fear behavior · Defensive behavior · Tonic immobility

Introduction

The most common animal response to fear or threat is the “fight-or-flight” response, in which the action of the sympathetic nervous system induces increased physical activity and systolic blood pressure, tachycardia and dilatation of vessels feeding skeletal muscle (Alboni et al. 2008). However, many animals can show a different response to fear or threat by remaining motionless, principally when attacked by predators from which there is no possibility of escape (Alboni et al. 2008). This phenomenon caused by a fear response is called tonic immobility (TI) in which a transitory and reversible state of profound motor inhibition can be induced in susceptible species (Kjerm 1971; Valance et al. 2008). TI might be also known by other names such as “animal hypnosis”, “immobilization catatonia” or “death-feigning” (Rusinova and Davydov 2010).

Some physiological changes observed during TI suggest that the autonomic nervous system (ANS) is strongly implicated in this process (Alboni et al. 2008). However, the differing contributions of the ANS’s subsystems (sympathetic and parasympathetic) are unclear during the TI process (Valance et al. 2008). Evidence suggests that TI is not associated with any suspension of consciousness (Marx et al. 2008) and, although the animals appear incapable of resisting or escaping, they seem to actively process the event and the environment (Gallup et al. 1972; Richardson et al. 1977; Sigman and Prestrude 1981). Thus, induction of TI appears to be influenced by the autonomic changes induced by the emotional response such as the mere presence of a predator or the situation where the animal is

A. T. Giannico · L. Lima · R. R. Lange · T. R. Froes · F. Montiani-Ferreira (✉)
 Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil
 e-mail: montiani@ufpr.br

A. T. Giannico
 e-mail: amaliaturner@uol.com.br

Eyelash Growth Induced by Topical Prostaglandin Analogues, Bimatoprost, Tafluprost, Travoprost, and Latanoprost in Rabbits

Amália Turner Giannico,¹ Leandro Lima,¹ Heloisa Helena Abil Russ,² and Fabiano Montiani-Ferreira¹

Abstract

Purpose: Prostaglandin analogues (PGA) are ocular hypotensive agents used for the treatment of glaucoma. Hypertrichosis of the eyelashes has been reported in humans as a side effect. Eyelash growth was investigated with clinical trials in people using bimatoprost. Scattered reports of eyelash growth during the treatment of glaucoma with other PGA are also found in the literature. We investigated the effect of 4 different topical PGA on eyelash length.

Methods: Forty New Zealand white rabbits were divided into 4 groups and received daily topical application of bimatoprost, tafluprost, travoprost, and latanoprost in the left eye for 4 weeks. The right eye received no treatment. Eyelash length was measured in both eyes before and after treatment using a stainless steel digital caliper.

Results: Bimatoprost and tafluprost groups had significant increases in eyelash length. We did not observe significant eyelash growth in rabbits receiving travoprost and latanoprost after 1 month of treatment.

Conclusions: Today, only bimatoprost is approved for growing eyelashes, and our research shows that tafluprost could be further explored by the cosmetic and pharmaceutical industry. Additional research using travoprost and latanoprost as agents for eyelash growth should be performed in the future using prolonged treatment periods to determinate whether or not these PGA induce eyelash growth, and investigate other possible side effects.

Introduction

EYELASHES, BESIDES PROVIDING a natural protective barrier against foreign bodies for the eyes, also possess an aesthetic function.^{1,2} In modern society, longer and fuller eyelashes are considered a desirable physical attribute on women and a sign of femininity and beauty.³

Since the beginning of the use of prostaglandin analogues (PGA) as an ocular hypotensive agent for the treatment of glaucoma, hypertrichosis of eyelashes has been reported as a side effect.^{1,4,5} Currently, a synthetic PGA, bimatoprost 0.03%, besides being used to lower intraocular pressure (IOP) is also approved for cosmetic purposes to increase eyelash length, thickness, and darkness in normal patients and in patients with palpebral hypotrichosis. For the latter use, the drug is applied topically to the skin of the eyelid margins.^{1,2,6}

Bimatoprost, tafluprost, travoprost, and latanoprost share many similarities both structurally and pharmacologically¹ and these PGA may have similar effects on eyelash growth. Several studies with human patients investigating these PGA

drugs for glaucoma treatment qualitatively reported eyelash growth, merely as a side effect.⁷⁻¹⁷ However, only bimatoprost and latanoprost have been studied in clinical trials with human beings that assessed quantitatively and specifically the eyelash growth.^{1,2,18-23} Body hair growth, but not eyelash growth has been investigated in animal models.²⁴⁻²⁶ The effect of PGA specifically on eyelash growth has not been studied in animals.

To the author's knowledge, this is the first study comparing eyelash growth secondary to the use of these topical PGA in a homogeneous group of animals. In this article, our goal was to evaluate and discuss the effects of 4 topical PGA on eyelash length in New Zealand white rabbits.

Methods

Animals

The investigation was carried out using 40 clinically healthy, 6-month-old New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), 19 males and 21 females, weighing an average 2.66 ± 0.03 kg

¹Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

²Instituto Gracé de Oftalmologia, Curitiba, Brazil.

Characterization of the oculocardiac reflex during compression of the globe in Beagle dogs and rabbits

Amália Turner Giannico,* Manuella O. B. de Sampaio,* Leandro Lima,* Clara Corona Ponczek,* Fátima De Lara* and Fabiano Montiani-Ferreira*†

*Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR, 80035-050, Brazil; and †Department of Small Animal Clinical Science, D-208 Veterinary Medical Center, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

Address communications to:

F. Montiani-Ferreira

Tel: +55 (41) 3350-5724

Fax: +55 (41) 3350-5725

e-mail: montiani@ufpr.br

Abstract

Objective This investigation characterizes the occurrence of oculocardiac reflex (OCR) in conscious rabbits and dogs by observing the effect of an ocular compression stimulus on heart rate (HR).

Animals studied Thirty-four clinically healthy adult rabbits and 15 clinically healthy adult Beagle dogs were studied.

Procedures An electrocardiogram was used to record the heart rhythm and HR continuously. Digital pressure was exerted over the eyelid on right eye, left eye and both eyes together for 1 min, with one-minute intervals between each compression. Variations in HR were observed in each minute by counting complexes on the electrocardiographs.

Results There were no differences in HR between stages without ocular compressions both in dogs and in rabbits. HR reduction caused by ocular compression was statistically significant in rabbits only when both eyes were compressed in contrast with all stages without compression. In dogs, a statistically significant reduction in HR was seen during compression of just the right eye or the left eye compared with the baseline HR, and when both the right and left eyes were compressed together compared with baseline or after compression of the right eye. In dogs, compression of individual eyes produced a change similar to that seen during compression of both eyes.

Conclusions This study shows that OCR can occur during experimental ocular compression in conscious rabbits and Beagle dogs and characterizes the reduction in HR. Knowledge of this physiological response is important for veterinary anesthetists and ophthalmologists during ophthalmic surgery or eye manipulations.

Key Words: dog, heart rate, ocular compression, oculocardiac reflex, rabbit

INTRODUCTION

The oculocardiac reflex (OCR) is the decrease in heart rate (HR) associated with traction applied to extraocular muscles or compression of the eyeball itself. It was first described in 1908 by Aschner and Dagnini.^{1,2} Anatomically, it consists of an afferent limb carried in the long and short ciliary nerves to the ciliary ganglion, from which the ophthalmic branch of the trigeminal nerve continues via the trigeminal ganglion to the main trigeminal sensory nucleus. The afferent pathway continues along the short internuncial fibers in the reticular formation to connect with the efferent pathway in the motor nucleus of the vagus nerve. Cardio-inhibitory efferent

fibers arising from the motor nucleus of the vagus nerve terminate in the myocardium. These vagal stimuli provoke negative chronotropic and inotropic responses.³ In clinical terms, the OCR is a physiological response of the heart to physical stimulation of the eye or the ocular adnexa, characterized by a decrease in HR or, in some cases, arrhythmias such as ventricular and supraventricular complexes.^{3–5}

These alterations in cardiac rhythm may occur when the ophthalmic division of the trigeminal nerve is stimulated by manipulation of ocular and periocular structures,⁶ commonly as a consequence of traction during extraocular involving muscle resection or manipulation of extraocular muscles during other eye surgeries.⁷



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS

DECLARAÇÃO

Declaramos para fins de comprovação junto à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, que nada consta em nossos registros referente a débito por parte de **LEANDRO LIMA**, nesta biblioteca.

E, por ser verdade firmo a presente.

Curitiba, 09 de março de 2015.



Maria Simone Utida dos Santos Amadeu
Bibliotecária/Chefe