

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELE LOPES IZAR

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DE RECEPTORES OPIOIDES
CORNEAIS E AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE SOLUÇÃO DE SULFATO
DE MORFINA EM PACIENTES COM CERATITE ULCERATIVA

CURITIBA

2012

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

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DE RECEPTORES OPIOIDES
CORNEAIS E AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE SOLUÇÃO DE SULFATO
DE MORFINA EM PACIENTES COM CERATITE ULCERATIVA

CURITIBA

2012

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

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DE RECEPTORES OPIOIDES
CORNEAIS E AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE SOLUÇÃO DE SULFATO
DE MORFINA EM PACIENTES COM CERATITE ULCERATIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Universidade Federal do Paraná
como requisito à obtenção do título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo G.D´O.C. Vilani

CURITIBA

2012



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DE RECEPTORES OPIOIDES CORNEAIS E AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE SOLUÇÃO DE SULFATO DE MORFINA EM PACIENTES COM CERATITE ULCERATIVA”** apresentada pela Mestranda MICHELE LOPES IZAR declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 15 de março de 2012

Professor Dr. Ricardo Guilherme D'Otaviano de C. Vilani
Presidente/Orientador

Professora Dra. Valéria Nobre Leal de Souza Oliva
Membro

Professor Dr. Peterson Triches Dornbusch
Membro

Dedico esta dissertação à Deus, por ter me dado uma nova chance e aos meus pais, Roberto e Shirlei, pelo amor e apoio, fundamentais para que este dia se tornasse realidade. Obrigada por tudo, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, fonte de inspiração e por ter me dado uma nova chance, por permitir que eu continuasse minha caminhada nesta vida e por ter me feito crescer como pessoa e como profissional.

Aos meus pais, meu porto seguro, por sempre acreditarem que eu iria superar os momentos difíceis, nos quais vocês sempre estiveram ao meu lado para que eu pudesse superar.

A minha irmã e meu cunhado pela ajuda nos momentos difíceis, por confiarem em mim, como profissional, pra cuidar dos meus “sobrinhos” queridos, Frederico, Ziggy e Woody.

Aos meus avós, Iza e Arecili, exemplos de vida, por sempre acreditarem que eu iria ter sucesso em tudo que pensasse em fazer na vida.

As Médicas Veterinárias Thais Gislou, Carolina Locowicz e Paola Branco e a acadêmica Elizabeth Carvalho. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho, sem ela este trabalho não teria ocorrido.

Ao Prof. Dr. Renato Silva de Souza, por disponibilizar o laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná para confecção das lâminas de imunohistoquímica, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo empenho em sempre tentar achar soluções quando as coisas não saiam como deveriam.

Ao Prof. Dr. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk e Prof. Dr. Ivan Deconto por sempre acreditarem em mim e sempre me incentivarem a ser cada vez melhor na minha profissão.

A todos os Médicos Veterinários Residentes do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, minhas amigas Wanessa, Isabel, Cintia, Janaína, pelas festas, pela amizade. Momentos que jamais serão esquecidos.

Aos Professores Dr. Valéria Nobre Leal de Souza Oliva e Peterson Triches Dornbush, por aceitarem participar desta banca e por acreditarem no potencial deste trabalho.

Ao Governo Federal do Brasil, por ter criado o projeto REUNI, possibilitando uma bolsa de estudo para que eu pudesse realizar este mestrado.

E, finalmente, ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani, por ter me ensinado a maravilhosa arte da Anestesiologia Veterinária, pela amizade, pelos ensinamentos e, principalmente pela paciência.

“Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande realização.”

Martin Luther King

RESUMO

A córnea é um dos tecidos mais ricamente inervados do organismo e quando lesionada observa-se sinais de dor. Anti-inflamatórios esteroidais e não estereoidais são utilizados para tratamento de enfermidades inflamatórias e infecciosas, porém promovem redução no grau de cicatrização corneana, mesmo minimizando o desconforto causado pela dor. Por existirem receptores opioides na córnea, o uso tópico de solução de sulfato de morfina 1% pode promover a analgesia necessária ao tratamento de úlceras, sem prejudicar a cicatrização. Esta dissertação é composta por três trabalhos, os quais abordam a utilização de opioide administrado por via tópica na córnea. O primeiro trabalho aborda a detecção da presença de receptores opioides OP1, OP2 e OP3 na córnea íntegra e ulcerada de ratos, utilizando técnica de imunohistoquímica. A comparação da ação analgésica e efeitos na cicatrização de sulfato de morfina 1% e diclofenaco sódico em coelhos com úlcera de córnea induzida foi abordada no segundo capítulo. O terceiro e último capítulo teve por objetivo avaliar a ação da morfina na córnea íntegra, para tentar comprovar possíveis efeitos adversos observados no segundo capítulo. Foi avaliada a ação da solução de sulfato de morfina 1% em cães com córnea íntegra.

Palavras-chave: opioide, córnea, úlcera, diclofenaco

ABSTRACT

The cornea is one of the most highly innervated tissues in the body and when injured, it is associated with pain. Steroidal and non-steroidal anti-inflammatories are used to treat inflammatory and infectious diseases, however they promote reduction in the corneal cicatrization. As there are opioid receptors in the cornea, their topical use can promote the necessary analgesia in the treatment of ulcers, with no disadvantage in cicatrization. This dissertation comprise three parts, which approach the utilization of topical opioid in the cornea. The first part approaches the detection of the presence of opioid receptors OP1, OP2 and OP3 in the intact and ulcerated cornea of rats, using the immunohistochemical technique. The comparison of the analgesic action and effects in the cicatrization of the 1% morphine sulfate and diclofenac sodium in rabbits with induced ulcerated cornea was approached in the second chapter. The third and last chapter evaluated the action of 1% morphine sulfate in the intact cornea of dogs.

Key words: opioids, corneal ulcer, diclofenac

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2.1.	Úlcera de córnea corada por fluoresceína.....	7
2.2.	Comparação de média e desvio padrão em pixels dos receptores opioides em cortes com e sem lesão.....	9
2.3.	Comparação da quantidade, em pixels, de receptores opioides observada em córnea de ratos com e sem lesão ulcerativa.....	9
2.4.	Imagem representativa de lâminas de imunohistoquímica para Receptores δ . A: Imunohistoquímica de corte de olho sem lesão, B: imunohistoquímica de corte de olho com lesão.....	10
2.5.	Imagem representativa de lâminas de imunohistoquímica para Receptores κ . A: Imunohistoquímica de corte de olho sem lesão, B: imunohistoquímica de corte de olho com lesão.....	10
2.6.	Imagem representativa de lâminas de imunohistoquímica para Receptores μ . A: Imunohistoquímica de corte de olho sem lesão, B: imunohistoquímica de corte de olho com lesão.....	11
3.1.	Escala de dor ocular utilizada para coelhos com úlcera de córnea superficial induzida.....	24
3.2.	Número de animais positivos para coloração de Fluoresceína em coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	24
3.3.	Olhos com úlceras de córnea superficial de 7mm induzidas e coradas com fluoresceína (Dia 0), e a evolução durante o tratamento tópico com cloreto de sódio 0,9% (GC) diclofenaco sódico 0,1% (GD) e sulfato de morfina 1% (GM). Evolução do dia 1 ao dia 5 de tratamento.....	25
3.4.	Valores da sensibilidade da córnea aferida por estesiometro de CochetBonnet para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	26
3.5.	Valores do diâmetro da lesão analisado pelo programa Image-Pro Plus para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	26

3.6.	Valores do diâmetro da lesão analisado pelo programa Image-Pro Plus para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	27
3.7.	Valores para escala de alteração comportamental para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	27
3.8.	Valores para escala de alteração comportamental para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	28
3.9.	Valores da pressão intra-ocular avaliada por tonômetro de Schiötz para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	28
3.10.	Valores da pressão intra-ocular avaliada por tonômetro de Schiötz para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM).....	29
4.1.	Parâmetros e valores atribuídos na escala de dor adotada para avaliação da dor ocular em cães.....	40
4.2.	Valores para escala de dor para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM).....	41
4.3.	Valores para diâmetro pupilar para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM).....	41
4.4.	Valores para teste lacrimal de Schirmer para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM).....	42
4.5.	Valores para estesiometria para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM).....	42
4.6.	Valores para pressão intraocular para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM).....	43

LISTA DE ABREVIações

AINES – Antiinflamatórios não esteroidais

OP3 – Receptor opioide do tipo 3 (μ)

OP1 – Receptor opioide do tipo 1 (δ)

OP2 – Receptor opioide do tipo 2 (κ)

μm – Micrometro

HE – Hematoxilina e eosina

M – Molar

DAB – Diaminobenzina

mm - Milímetros

GC – Grupo controle

GD – Grupo diclofenaco

GM – Grupo morfina

μg – Microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos Gerais.....	2
1.2. Objetivos Específicos.....	3
2. IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES OPIOIDES EM RATOS COM ÚLCERA DE CórNEA.....	4
2.1. Resumo.....	4
2.2. Abstract.....	5
2.3. Introdução.....	5
2.4. Material e Métodos.....	6
2.5. Resultados.....	8
2.6. Discussão.....	11
2.7. Conclusão.....	14
2.8. Referências.....	14
3. AÇÃO ANALGÉSICA E EFEITOS DO SULFATO DE MORFINA TÓPICO NA CICATRIZAÇÃO DE CERATITE ULCERATIVA EM COELHOS.....	18
3.1. Resumo.....	18
3.2. Abstract.....	19
3.3. Introdução.....	20
3.4. Material e Métodos.....	22
3.5. Resultados.....	24
3.6. Discussão.....	29
3.7. Conclusão.....	31
3.8. Referências.....	31
4. AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE SOLUÇÃO DE SULFATO DE MORFINA 1% EM OLHOS SAUDÁVEIS DE CÃES.....	36
4.1. Resumo.....	36
4.2. Abstract.....	37
4.3. Introdução.....	37
4.4. Material e Métodos.....	39

4.5.	Resultados.....	40
4.6.	Discussão.....	43
4.7.	Conclusão.....	45
4.8.	Referências.....	45
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49

1. INTRODUÇÃO

A córnea é um dos tecidos mais ricamente inervados do organismo, recebendo densa inervação sensorial do nervo trigêmeo e modesta inervação simpática do gânglio cervical superior, com importantes efeitos neuromodulatórios na cicatrização de lesões.

A ceratite ulcerativa, uma das doenças oculares mais comuns e importantes em animais domésticos, principalmente nos cães, leva à opacidade ocular, causando dor e baixa de acuidade visual nas diferentes espécies, inclusive em seres humanos.

Ocorre quando há perda do epitélio e uma quantidade variável de estroma, usualmente com origem traumática, podendo rapidamente apresentar contaminação bacteriana. Os sinais clínicos que levam a suspeitar de ulceração corneana são dor e blefaroespasma, epífora, secreção ocular purulenta e fotofobia. Em seres humanos, dor é o sintoma relatado mais prevalente.

O tratamento da ceratite ulcerativa inclui, além de erradicar a infecção, reduzir ou acabar com a destruição da córnea, minimizar cicatrizes, controlar a reação uveal e a dor associada.

Antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e corticosteróides são comumente utilizados para tratamento de enfermidades oculares inflamatórias não infecciosas em cães, porém, em lesões no epitélio corneano, o uso de corticosteróides é contra-indicado, devido suas propriedades imunossupressoras e antiproliferativas, levando a um atraso na cicatrização corneana.

AINES, como o diclofenaco sódico, utilizados topicamente para o controle do desconforto e dor estão associados com citotoxicidade e presença de infiltrados corneanos periféricos, também provocando retardo na cicatrização da córnea.

O alívio da dor ocular pode ser obtido também por meio do uso de agentes anestésicos tópicos como tetracaína e procaína, porém seu uso prolongado ou aplicações repetidas está associado com efeitos deletérios sobre o epitélio corneano, como inibição da reepitelização corneana, alterações

na aderência do filme lacrimal, aumento na permeabilidade corneana e edema que resultarão em perda da transparência corneana.

Há várias décadas, os opioides são utilizados por via parenteral para promover analgesia. Além do efeito de modulação da dor, vários estudos apontam que os opioides também promovem ação analgésica quando aplicadas em tecidos e neurônios periféricos, tanto por ação direta no sistema nervoso central quanto por ação em receptores periféricos.

Técnicas de imunohistoquímica foram utilizadas para identificar receptores μ (OP3) e δ (OP1) na córnea de cães. A solução tópica de morfina possui efeito analgésico em cães com úlcera induzida e na córnea ulcerada de coelhos e seres humanos sem prejudicar a cicatrização, porém não tem efeito em córnea íntegra (PEYMAN et al., 1994; STILES et al., 2003).

Até o presente momento, há somente dois estudos disponíveis na literatura por meio dos sites de busca Pubmed, Scielo ou Google sobre a utilização de solução de sulfato de morfina topicamente na córnea para controle de dor em pacientes com ceratite ulcerativa.

Uma possibilidade de adversidade à administração de morfina ocular tópica é a liberação de histamina, devido uma reação alérgica ao opioide ou ao veículo com sulfitos utilizado nas apresentações parenterais (TRESCOT et al., 2008)

A confirmação da existência de receptores opioides, além da detecção de seus subtipos, na córnea permitirá a aplicação clínica desta classe de fármacos diretamente neste sítio de ação. Desta forma, poderá ocorrer um incremento na sua potência e duração analgésica da morfina utilizada por esta via de administração, sem atraso na cicatrização.

1.1. Objetivos Gerais

Estudar os efeitos do uso de solução de sulfato de morfina na córnea quando administrado por via tópica.

1.2. Objetivos Específicos

a) detecção de receptores opioides e seus subtipos na córnea íntegra e ulcerada de ratos;

b) comparação da ação analgésica e efeitos na cicatrização de sulfato de morfina a 1% e diclofenaco sódico aplicados topicamente em coelhos com úlcera de córnea superficial induzida;

c) avaliação do uso de solução de sulfato de morfina em cães com córnea íntegra

2. IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES OPIOIDES EM RATOS COM ÚLCERA DE CÓRNEA

2.1. RESUMO

A ceratite ulcerativa caracteriza-se por perda de epitélio corneano e ativação de fibroblastos presentes no estroma, o que leva a uma edemaciação e migração de células inflamatórias com subsequente perda da integridade e transparência da córnea. Muitos estudos têm demonstrado a presença de receptores opioides OP1(δ), OP2 (κ) e OP3 (μ) em tecidos periféricos, mas apenas OP1 e OP3 na córnea de ratos, cães e primatas. O presente estudo teve por objetivo identificar a presença de receptores opioides OP1, OP2 e OP3 em córnea de ratos com e sem lesão ulcerativa. Foram estudados quatro olhos de *Rattus norvegicus* com lesão de córnea, além dos olhos contralaterais saudáveis, produzindo 64 lâminas que foram analisadas por meio de imunohistoquímica. Os três tipos de receptores opioides foram investigados, além de uma avaliação controle negativa sem anticorpo primário, contra corada com hematoxilina, e outra somente com coloração por hematoxilina e eosina, sem passar pelo processo de imunohistoquímica. Observou-se a presença de todos receptores estudados no estroma subepitelial da córnea, com uma maior prevalência de receptores, oriundos de células inflamatórias, nos olhos com úlcera de córnea quando comparados com cortes sem lesão ($\delta - p < 0,0001$, $\mu - p < 0,0001$, $\kappa - p < 0,0001$). Não houve diferença estatística quando comparada a quantidade de receptores κ , δ e μ tanto nos cortes com lesão como nos cortes sem lesão. Este estudo demonstrou que na lesão de córnea ocorre uma migração de células inflamatórias contendo receptores opioides no estroma subepitelial de ratos.

Palavras-chave: córnea, imunohistoquímica, receptor opioide

2.2. ABSTRACT

Ulcerative keratitis is characterized by loss of corneal epithelium with activation of stromal fibroblasts, which leads to an edema and migration of inflammatory cells with subsequent loss of integrity and corneal transparency. Many studies have shown the presence of opioid receptors OP1(δ), OP2 (κ) e OP3 (μ) in peripheral tissues, but only OP1 and OP3 in corneas of rats, dogs and primates. This study has aimed to identify the presence of opioid receptors OP1, OP2 and OP3 in rats corneas with and without ulcerative lesion. Four eyes with and other four eyes without corneal lesion in *Rattus norvegicus* were studied, producing 22 slides which were analysed by immunohistochemistry, for the three types of opioid receptors, besides a negative control evaluation without any antibody and another with hematoxylin staining. It was noticed the presence of all receptors studied in the cornea, with higher prevalence of receptors in the eyes with corneal ulcer when compared to sections without lesion ($\delta - p < 0,0001$, $\mu - p < 0,0001$, $\kappa - p < 0,0001$). There was no statistical difference when compared the number of receptors κ , δ e μ in the sections with and without lesion. This study showed that in corneal lesions occur a migration of inflammatory cells containing opioid receptors in the subepithelial stroma in rats.

Key words: cornea, immunohistochemical, opioid receptor

2.3. INTRODUÇÃO

O epitélio corneano íntegro é uma barreira contra bactérias invasoras. Modula o transporte de fluido para manter a hidratação do estroma e a transparência corneana. (ZAGON et al., 2005; PRADO et al., 2006). A ceratite ulcerativa caracteriza-se por perda de epitélio da córnea e ativação de fibroblastos presentes no estroma, o que leva a uma edemaciação no estroma e migração de células inflamatórias com subsequente perda da integridade e transparência corneana (PRADO et al., 2006).

A córnea é um dos tecidos mais ricamente inervados do organismo, recebendo densa inervação sensorial do nervo trigêmeo e modesta inervação simpática do gânglio cervical superior, apresentando desta forma importante

efeitos neuromodulatório nociceptivo durante a cicatrização de lesões (ROZSA e BEUERMAN, 1982; DE FELIPE et al., 1999; MARFURT et al., 2001).

Vários estudos demonstraram a presença de receptores opioides OP1(δ), OP2 (κ) e OP3 (μ) em tecidos periféricos. Na córnea, existem relatos de receptores opioides OP1 e OP3 em ratos, cães, macacos e seres humanos, além de um neuropeptídeo, a [Met⁵]-encefalina, o qual age em receptores opioides zeta (ζ) e é responsável pela homeostase corneana (ZAGON et al., 1995; WENK e HONDA, 1999; STILES et al., 2003; ZÖLLNER et al., 2008). Os opioides parecem ter ação na homeostase e renovação celular do epitélio corneano, tendo os peptídeos opioides endógenos papel importante na reparação de lesões corneanas (ZAGON et al., 1998).

Leucócitos contendo opioides podem neutralizar a hiperalgisia inflamatória. Submetidos a estresse ou após injeção de fator de liberação de corticotropina, peptídeos opioides serão liberados por leucócitos, ligando-se aos receptores opioides presentes em neurônios sensoriais periféricos, promovendo analgesia. Como os leucócitos são as células polimorfonucleares predominantes no início da inflamação acredita-se que uma subpopulação de leucócitos contendo opioides é recrutada por quimiocinas, auxiliando na antinocicepção mediada por opioides (BRACK et al., 2004).

O presente estudo teve por objetivo identificar e quantificar por avaliação imunohistoquímica receptores opioides μ (OP3), κ (OP2) e δ (OP1) em córnea de ratos com e sem lesão ulcerativa.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, por meio do protocolo número 012/2010.

Quatro ratos (*Rattus norvegicus*), que apresentavam lesão ulcerativa de córnea unilateral, confirmadas pela coloração de fluoresceína e caracterizada como aguda pelo aspecto da lesão, como ausência de neovascularização

corneana (Figura 2.1.), sofreram eutanásia em câmara com alta concentração de isoflurano. Os olhos com lesão e os contralaterais foram coletados imediatamente, lavados e imersos em solução de Davidson (Formol 10% 200ml, Álcool Etílico 95% 300ml, Ácido Acético Glacial, 100ml e Água Destilada 300ml) para fixação por 24 horas.

Foram obtidos cortes de 5 μ m de todo o bulbo ocular por microtomia com parafina. Foram desafiadas por imunohistoquímica 10 lâminas para receptor OP1(δ), 10 para OP2 (κ) e 10 para OP3 (μ) com lesão e outros dez cortes de cada receptor sem lesão. Além disso, um corte com e outro sem lesão para controle negativo, onde não foi adicionado anticorpo primário, e um corte com e outro sem lesão para coloração somente com HE foram analisados.



Figura 2.1. - Úlcera de córnea corada por Fluoresceína

Os cortes foram desparafinados e hidratados em xilol e álcool e posteriormente fez-se a recuperação antigênica, com as lâminas imersas em tampão citrato, durante 10 minutos em microondas. Seguiu-se com incubação por 8 minutos em peróxido de hidrogênio a 3%, para bloqueio da peroxidase endógena, enxágue em tampão fosfato 0,1 M, incubação com proteína bloqueadora¹ durante 30 minutos e incubação no anticorpo primário durante aproximadamente 18 horas (*overnight*) em geladeira e câmara escura. Utilizaram-se três diferentes anticorpos primários: Anticorpo Policlonal de

¹ Vectastain Elite ABC Kit, Vector LAB, Califórnia, EUA

Coelho Anti Receptor μ -Opioide² em diluição 1:500, Anticorpo Policlonal de Coelho Anti Receptor δ -Opioide³ em diluição 1:500 e Anticorpo Policlonal de Coelho Anti Receptor κ -Opioide⁴ em diluição 1:500. Após incubação, o tecido foi novamente lavado em tampão fosfato 0,1 M e na sequência incubados por 30 minutos com anticorpo secundário¹ na diluição 1:500 e novamente lavados com tampão. Incubaram-se os cortes com o reagente enzimático⁵ durante 30 minutos e nova lavagem com tampão. A última incubação foi feita com o cromógeno diaminobenzina – DAB⁶ (substrato peroxidase) até se obter a coloração desejada, aproximadamente 15 segundos. Para as lâminas do controle negativo, preparadas por imunohistoquímica, somente não foi adicionado o anticorpo primário, sendo contra coradas com hematoxilina. Ainda como controle negativo, foram preparadas uma lâmina com lesão e uma lâmina sem lesão somente corada com coloração de HE.

Para finalização, as lâminas foram lavadas em água corrente e montadas para análise em microscópio. Foi obtida imagem do microscópio de um campo de cada lâmina em aumento de 40 vezes, através de câmera fotográfica digital, transferidas ao computador e analisadas pelo programa Image-Pro Plus⁷ que faz a contagem de pontos na mesma faixa de cor, ou seja, através de medição por pixels da imagem.

Utilizou-se teste T para comparação entre cortes com lesão e sem lesão e Análise de Variância (ANOVA) para comparação entre os receptores, por meio do programa estatístico Statview⁸.

2.5. RESULTADOS

Observou-se nos cortes com lesão uma maior prevalência de receptores quando comparados com cortes sem lesão (Figura 2.2).

² AB5511 Chemicon International, Califórnia, EUA

³ AB1560 Chemicon International, Califórnia, EUA

⁴ AB5507 Chemicon International, Califórnia, EUA

⁵ Vectastain Elite ABC Reagent, Vector LAB, Califórnia, EUA

⁶ ImmPACT DAB SK-4105 Vector LAB, Califórnia, EUA

⁷ versão 6.0 Medial Cybernetics, Maryland, EUA

⁸ Statview para Windows versão 5.0.1.

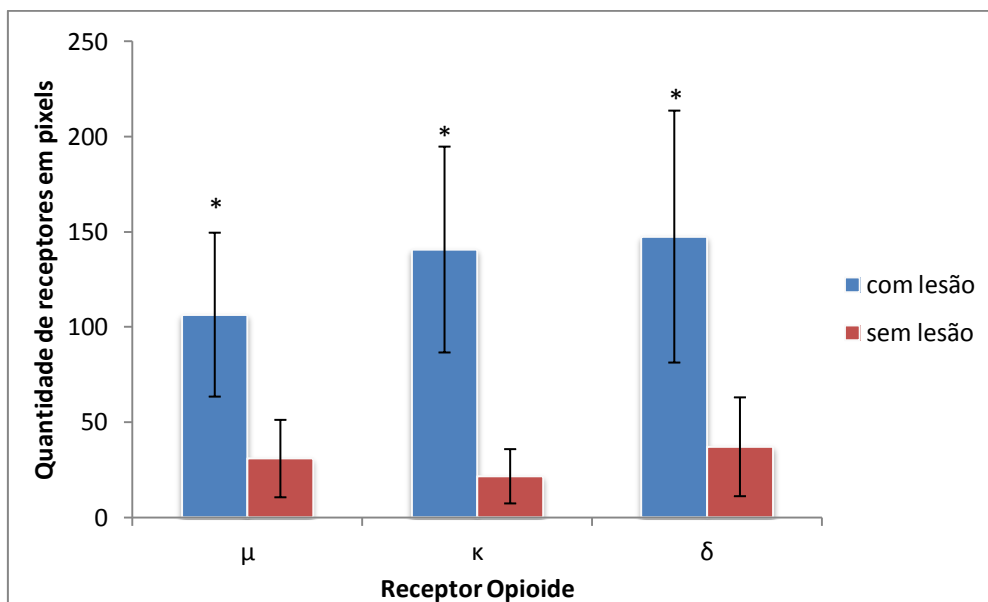
RECEPTOR	SEM LESÃO		COM LESÃO	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
δ	37,1	25,951	147,4	66,173
μ	30,9	20,333	106,5	43,051
κ	21,6	14,261	140,7	54,070

Figura 2.2. Comparação de média e desvio padrão em pixels dos receptores opioides em cortes com e sem lesão.

Não houve diferença estatística quando comparada a quantidade de receptores κ , δ e μ tanto nos cortes com lesão como nos cortes sem lesão (Figura 2.3.).

A coloração marrom observada na área de transição entre o epitélio corneano e o estroma é a mesma área marcada em coloração de HE, onde se observam neutrófilos.

Nos cortes utilizados como controle negativo não se observa a coloração marrom, somente a contra coloração com hematoxilina (Figura 2.4.; 2.5. e 2.6.).



Nota: * valores com significância estatística ($p < 0,05$) entre olhos com lesão e sem lesão.

Figura 2.3. - Comparação da quantidade, em pixels, de receptores opioides observada em córnea de ratos com e sem lesão ulcerativa.

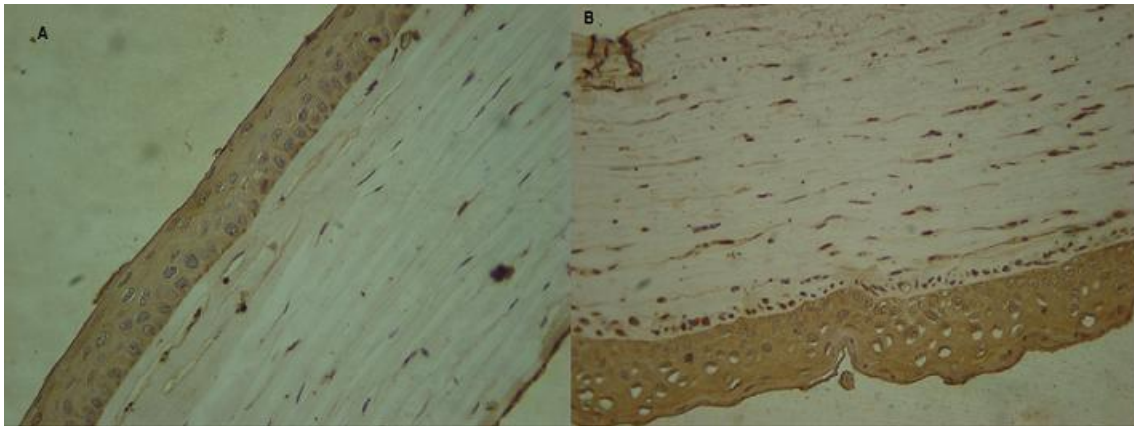


Figura 2.4. - Imagem representativa de lâminas de imunohistoquímica para Receptores δ . A: Imunohistoquímica de corte de olho sem lesão, B: imunohistoquímica de corte de olho com lesão

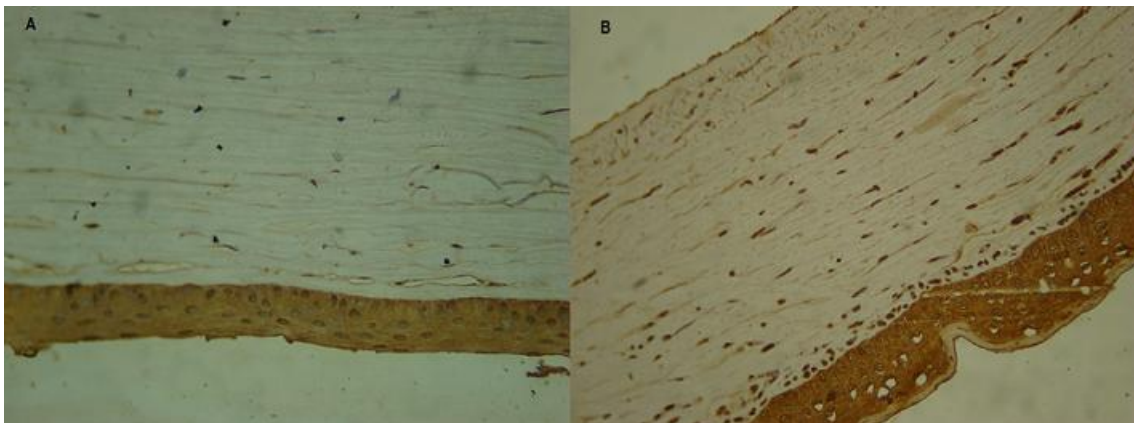


Figura 2.5. - Imagem representativa de lâminas de imunohistoquímica para Receptores κ . A: Imunohistoquímica de corte de olho sem lesão, B: imunohistoquímica de corte de olho com lesão

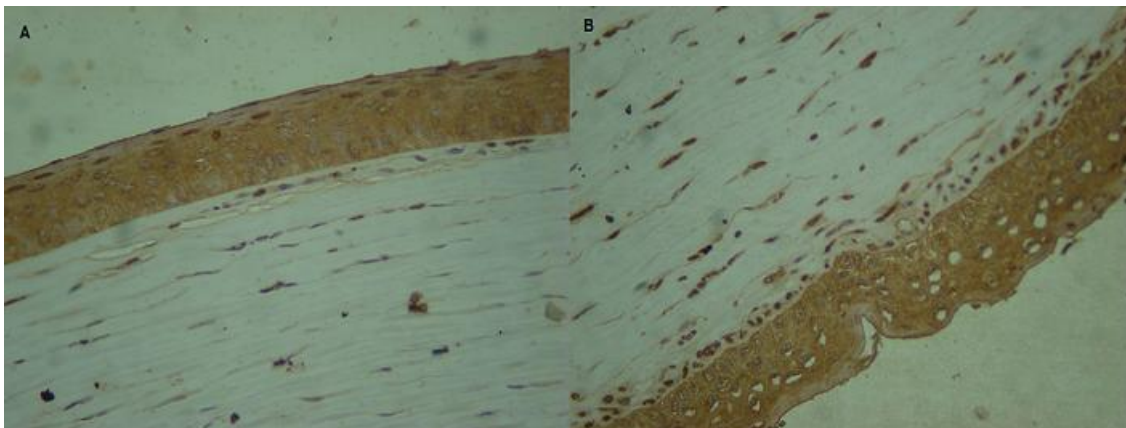


Figura 2.6. – Imagem representativa de lâminas de imunohistoquímica para Receptores μ . A: Imunohistoquímica de corte de olho sem lesão, B: imunohistoquímica de corte de olho com lesão

2.6. DISCUSSÃO

Receptores δ -opioides já tinham sido identificados em córnea e limbo de ratos, sendo observada a presença deste receptor na região subepitelial, pericorneana e nas camadas superficiais do epitélio corneano, utilizando anticorpo anti-receptor δ de coelho, analisado por microscópio fluorescente (WENK e HONDA, 1999). Também foram identificados, pela mesma técnica, receptores opiáceos μ e δ em córnea normal de cães observando subjetivamente uma maior prevalência de receptores δ em grandes axônios no estroma anterior, bem como em pequenas fibras no estroma subepitelial e terminações nervosas dentro do epitélio corneano. Receptores μ foram observados em pequena quantidade, estando localizados principalmente no estroma anterior e subepitelial (STILES et al., 2003).

Observou-se a presença de receptores κ , na mesma concentração dos receptores μ e δ principalmente no estroma subepitelial da córnea íntegra de ratos. A presença de receptores κ foi sugerida em estudo realizado com a administração tópica nalbufina, um opioide agonista de receptores κ , em córnea de cães (CLARK et al., 2011). Quando instalada a lesão de córnea, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração dos três tipos de receptores, destacadamente dos receptores κ (apesar de não ter sido

observada diferença estatística entre os tipos de receptores, $p=0,17$), pela migração de leucócitos para o estroma subepitelial.

A perda de epitélio da córnea e ativação de fibroblastos presentes no estroma, caracterizada na úlcera corneana, leva a uma edemaciação e migração de células inflamatórias (PRADO et al., 2006). Leucócitos contendo receptores opioides são recrutados para tecidos inflamados, secretando peptídeos opioides, que se ligam a receptores opioides expressos em terminações nervosas sensoriais. Estímulos locais e liberação de corticotropina ou citocinas podem promover a liberação desses peptídeos opioides para promover analgesia localizada, efeito este não observado em casos de imunossupressão (STEIN et al., 2001). Como pode ser observado no presente estudo, quando não há inflamação não se observa a presença de leucócitos contendo receptores opioides, sendo que apenas alguns neurônios periféricos expressam esses receptores (STEIN et al., 1990; MACHELSKA et al., 1998; MOUSA et al., 2002; STEIN et al., 2003; BRACK et al., 2004).

Após duas horas de instalação do processo inflamatório já se observa a presença de fator de liberação de corticotropina induzindo a liberação de opioides por leucócitos, que irão atuar na nocicepção promovendo analgesia (BRACK et al., 2004). Quase todos os leucócitos contendo opioide expressam receptores para quimiocinas, receptor para queratinócitos derivados de quimiocinas e proteína inflamatória de macrófagos, sendo esses receptores essenciais para o recrutamento de polimorfonucleares contendo opioide que irão atuar no controle da nocicepção para promover analgesia (BRACK et al., 2004).

24h após a retirada dos olhos com e sem lesão, puderam ser detectados os três tipos estudados de receptores opioides. Os componentes centrais e periféricos para inibição da dor podem se alterar com o desenvolvimento da inflamação. Com seis horas de processo inflamatório instalado observam-se quantidades semelhantes de células contendo peptídeos opioide (β -endorfinas, met-enkefalina e dinorfina A), atuando simultaneamente nos três tipos de receptores opioides. No quarto dia do processo inflamatório, porém, as células que prevalecem são as que contêm β -endorfinas, atuando em receptores μ e δ . Desta maneira, após seis horas, receptores opioides centrais e periféricos

estão envolvidos no controle analgésico e no quarto dia a antinocicepção endógena é mediada exclusivamente por receptores opioides periféricos. Portanto, em processos inflamatórios crônicos os mecanismos opioides periféricos para analgesia são mais prevalentes (MACHELSKA et al., 2003).

Mesmo com a confirmação da migração de leucócitos contendo os três subtipos de receptores opioides, a expressão analgésica só poderá ocorrer na presença desses receptores na célula nervosa periférica, que como demonstrado, ocorrem em pequena quantidade. Receptores opioides, assim como neuropeptídios e outras proteínas, são sintetizados em gânglios da raiz dorsal, sendo carregados por via axonal para terminais centrais e periféricos (STEIN et al., 2001). A expressão destes receptores opioides pode ser modulada por reação inflamatória próxima a terminais de neurônios aferentes primários, caracterizado no presente estudo pela expressão leucocitária de receptores opioides (STEIN et al., 2001). O transporte axonal do receptor opioide é aumentado devido à liberação de interleucina 1β (IL- 1β), levando a um aumento na eficácia do agonista em nervos periféricos (STEIN et al., 2003).

O baixo pH do meio onde há inflamação pode ainda aumentar a eficácia do agonista opioide pelo aumento do acoplamento da proteína G, elevando os níveis de AMPc neuronal. Inflamação aumenta o número de terminações nervosas sensoriais e interrompe a barreira perineural, facilitando o acesso do opioide agonista ao seu receptor (STEIN et al., 2003).

O uso de opioides tem demonstrado inibição da inflamação neurogênica através da diminuição na liberação de substância P nos terminais de neurônios aferentes primários. Os receptores opioides presentes em células do sistema imunológico suprimem a função de linfócitos, bem como a síntese e liberação de citocinas (STEIN et al., 2001; STEIN et al., 2003). Com isso, morfina administrada topicamente reduz o desenvolvimento de inflamação em córnea de ratos com lesão induzida quimicamente, além de induzir analgesia, o que não ocorre na córnea íntegra. (WENK et al., 2003). O aumento de receptores opioides frente a lesões suporta a existência de um sistema de opioides endógenos na córnea, sendo ativado em presença de inflamação.

Um peptídeo opiáceo autócrino, ([Met⁵]-encefalina), secretado por células do epitélio corneano e seu receptor foram detectados em ratos, porém no presente estudo não foi analisada a presença ou ausência deste peptídeo e

seu receptor. A sequência de nucleotídeos deste receptor não se assemelha aos receptores opiáceos clássicos. Possivelmente, o sistema peptídeo-receptor seja responsável pela manutenção da homeostase corneana e esteja envolvido no reparo de lesões do epitélio corneano. Quando utilizado a naltrexona, um antagonista opioide, houve uma redução no tempo de cicatrização de úlceras corneanas (ZAGON et al., 2005). Por outro lado, a administração de agonista opioide em nervos sem lesão não produz efeitos analgésicos confiáveis, confirmando que a inflamação promove acessibilidade e eficiente acoplamento do receptor opioide em neurônios aferentes primários (SCHULTE-STEINBERG et al., 1995; PICARD et al., 1997; MURPHY et al., 2000; LIKAR et al., 2001).

2.7. CONCLUSÃO

Com este estudo pode-se concluir que receptores opioides estão presentes em pequena quantidade em córnea íntegra de ratos, porém em lesões agudas de córnea há uma migração de células inflamatórias contendo receptores opioides OP1, OP2 e OP3 no estroma subepitelial.

2.8. REFERÊNCIAS

BRACK, A.; RITTNER, H.L.; MACHELSKA, H.; SHAQURA, M.; MOUSA, S.A.; LABUZ, D.; ZÖLLNER, C.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. **Pain**. v.108, p. 67-75, 2004.

BRACK, A.; RITTNER, H.L.; MACHELSKA, H.; LEDER, K.; MOUSA, S.A.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**. v.112, p. 229-238, 2004.

CLARK, J.S.; BENTLEY, E.; SMITH, L.J. Evaluation of topical nalbuphine or oral tramadol as analgesics for corneal pain in dogs: a pilot study. **Veterinary ophthalmology**. v.14, p.358-364, 2011.

DE FELIPE, C.; GONZALES, G.G.; GALLAR, J.; BELMONTE, C. Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. **European Journal of Pain.** v.3, p. 31-39, 1999.

LIKAR, R.; KOPPERT, W.; BLATNIG, H.; CHIARI, F.; SITTL, R.; STEIN, C.; SCHÄFER, M. Efficacy of peripheral morphine analgesia in inflamed, non-inflamed and perineural tissue of dental surgery patients. **Journal of Pain and Symptom Management.** v.21, p. 330-337, 2001.

MACHELSKA, H.; CABOT, P.J., MOUSA, S.A., ZHANG, Q.; STEIN, C. Pain control in inflammation governed by selectins. **Nature Medicine.** v.4, p. 1425-1428, 1998.

MACHELSKA, H.; SCHOPOHL, J.K.; MOUSA, A.; LABUZ, D.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. **Journal of Neuroimmunology.** v. 141, p. 30-39, 2003.

MARFURT, C.F.; MURPHY, C.J.; FLORCZAK, J.L. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science.** v. 42, p.2244-2251, 2001.

MOUSA, S.A.; MACHELSKA, H.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. **Journal of Neuroimmunology.** v.126, p. 5-15, 2002.

MURPHY, D.B.; MCCARTNEY, C.J.; CHAN, V.W. Novel analgesic adjuncts for brachial plexus block: a systematic review. **Anesthesia and Analgesia Journal.** v.90, p. 1122-1128, 2000.

PICARD, P.R.; TRAMER, M.R.; MCQUAY, H.J.; MOORE, R.A. Analgesic efficacy of peripheral opioids (all except intra-articular): a qualitative systematic review of randomized controlled trials. **Pain.** v.72, p. 309-318, 1997.

PRADO, M.R.; BRITO, E.H.S.; GIRÃO, M.D.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Identification and antimicrobial susceptibility of bacterial isolated from corneal ulcers of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, p.1024-1029, 2006.

ROSZA, A.J.; BEUERMAN, R.W. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. **Pain**. v.14, p.105-120, 1982.

SCHULTE-STEINBERG, H.; WENINGER, E.; JOKISCH, D.; HOFSTETTER, B.; MISERA, A.; LANGE, V.; STEIN, C. Intraperitoneal versus interpleural morphine ou bupivacaine for pain after laparoscopic cholecystectomy. **Anesthesiology**. v.82, p 634-640, 1995.

STEIN, C.; GRAMSCH, C.; HERZ, A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. **The Journal of Neuroscience**. v.10, p. 1292-1298, 1990.

STEIN, C.; MACHELSKA, H.; SCHÄFER, M. Peripheral analgesic and anti-inflammatory effects of opioids. **Zeitschrift für Rheumatologie**. v.60, n.6, p. 416-424, 2001.

STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**. v.9, p. 1003-1008, 2003.

STILES, J.; HONDA, C.N.; KROHNE, S.G.; KAZACOS, E.A. Effect of topical administration of 1% morphine sulfate solution on signs of pain and corneal wound healing in dogs. **American Journal Veterinary Research**. v.64, n.7, p.813-818, 2003.

WENK, H.N.; HONDA, C.N. Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. **The Journal of Comparative Neurology**. v.408, p. 567-579, 1999.

WENK, H.N.; NANNENGA, M.N.; HONDA, C.N. Effect of morphine sulphate eye drops on hyperalgesia in the rat cornea. **Pain**. v.105, p. 455-465, 2003.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; ALLISON, G.; MCLAUGHLIN, P.J. Conserved expression of the opioid growth factor, [Met⁵]-enkephalin, and the zeta (ζ) opioid receptor in vertebrate cornea. **Brain Research**. v.671, p. 105-111, 1995.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; MCLAUGHLIN, P.J. Re-epithelization of the rat cornea is accelerated by blockade of opioid receptors. **Brain Research**. v.798, p. 254-260, 1998.

ZAGON, I.S.; JOSEPH, W.S.; VERDERAME, M.F.; MCLAUGHLIN, P.J. Particle-mediated gene transfer of opioid growth factor receptor cDNA regulates cell proliferation of the corneal epithelium. **Cornea**. v.24, n.5, p. 614-619, 2005.

ZÖLLNER, C.; MOUSA, S.; KLINGER, A.; FÖRSTER, M.; SCHÄFER M. Topical fentanyl in a randomized, double-blind study in patients with corneal damage. **The Clinical Journal of Pain**. v.24, p. 690-696, 2008.

3. AÇÃO ANALGÉSICA E EFEITOS DO SULFATO DE MORFINA TÓPICO NA CICATRIZAÇÃO DE CERATITE ULCERATIVA EM COELHOS

3.1. RESUMO

A córnea é um tecido ricamente innervado e quando lesionado está associado a dor, e o tratamento tópico com antiinflamatório não esteroideal pode promover atraso na cicatrização. Por existirem receptores opioides na córnea, o uso tópico de sulfato de morfina pode promover analgesia no tratamento de úlceras de córnea, sem prejudicar a cicatrização. O objetivo deste estudo foi comparar a ação analgésica e efeitos na cicatrização do sulfato de morfina 1% e diclofenaco sódico 0,1% aplicados topicamente em coelhos com úlcera de córnea superficial induzida. Vinte e quatro coelhos com úlcera de córnea superficial de 7 mm induzida unilateralmente foram separados em três grupos e tratados topicamente a cada 6 horas com a instilação de uma gota de tobramicina 0,3% e após 15 minutos a instilação de uma gota do colírio de cloreto de sódio 0,9% no grupo controle (GC, n=8); diclofenaco sódico 0,1% no grupo diclofenaco (GD, n=8); e sulfato de morfina 1% no grupo morfina (GM, n=8). Para avaliar a eficácia dos tratamentos foram mensurados diariamente sensibilidade corneal utilizando estesiômetro de Cochet-Bonnet, pressão intraocular, produção lacrimal, diâmetro pupilar, blefaroespasma com e sem fonte de luz e hiperemia conjuntival, sendo estes dados avaliados em conjunto através de escala de dor. A área ulcerada, bem como o tempo para completa cicatrização corneana, foi mensurada após coloração com fluoresceína, por meio de captação de imagem com câmera fotográfica digital antes da primeira aplicação do dia até a completa recuperação. O grupo morfina e o controle apresentaram tempos de cicatrização semelhantes, com menor área ulcerada no GM no quarto dia da lesão, enquanto que o grupo diclofenaco apresentou atraso na cicatrização (GD-GC $p=0,0003$; GD-GM $p=0,0047$). Pela avaliação comportamental dos animais, no dia 1, antes e após a administração dos colírios observou-se uma mudança comportamental maior nos animais do GD (GM-GD $p=0,0011$; GC-GD $p=0,0008$), bem como no dia 2, antes e após a administração (GC-GD $p=0,0058$; GM-GD $p=0,0339$). O uso do colírio de sulfato de morfina 1% em associação com a tobramicina 0,3% não provocou atraso na

cicatrização corneana, porém apresentou efeito analgésico semelhante aos demais grupos.

Palavras-chave: córnea, morfina, diclofenaco, úlcera de córnea

3.2. ABSTRACT

The cornea is a highly innervated tissue and when injured, it is associated with pain. The topical treatment with non-steroidal anti-inflammatories can promote delayed healing. As there are opioid receptors in the cornea, the topical use of morphine sulfate can promote analgesia in the treatment of corneal ulcers, with no damage in cicatrization. The aim of this study was to compare the analgesic action and the healing effects of the 1% morphine sulfate and 0.1% diclofenac sodium topically applied in rabbits with induced superficial corneal ulcer. Twenty-four rabbits with superficial corneal ulcer of 7 mm, unilaterally induced, were separated in three groups and topically treated every six hours with the instillation of one drop of 0.3% tobramycin and after 15 minutes the instillation of one drop of the 0.9% sodium chloride collyrium in the control group (CG, n=8); 0.1% diclofenac sodium in the diclofenac group (DG, n=8); and 1% morphine sulfate in the morphine group (MG, n=8). To evaluate the efficacy of the treatments were daily measured corneal sensitivity using the Cochet-Bonnet esthesiometer, intraocular pressure, lacrimal production, pupil diameter, blepharospasm with and without light source and conjunctival hyperemia. All these items were evaluated together using a pain scale. The ulcerated area, as well as the time for corneal complete healing, was measured after fluorescein staining, by image of a digital camera, before the first application in the day, until complete healing. The morphine and control group presented similar healing times while the diclofenac group presented delayed healing (DG-CG $p=0,0003$; DG-MG $p=0,0047$). For behavioral assessment of the animals on day 1, before and after administration of eye drops observed a greater behavioral change in animals GD (GM-GD $p=0.0011$, GC, GD $p=0.0008$) and on day 2, before and after administration (GC-GD $p=0.0058$; GM-GD

$p=0.0339$). The use of 1% morphine sulfate collyrium in association with 0,3% tobramycin did not promote delay in corneal cicatrization, however it presented similar analgesia to the other groups.

Key words: cornea, morphine, diclofenac, corneal ulcer

3.3. INTRODUÇÃO

Úlcera de córnea, ou ceratite ulcerativa, é uma das doenças oculares mais comuns em cães e gatos. A maioria dos casos apresenta origem traumática e pode rapidamente apresentar contaminação bacteriana. Úlceras superficiais apresentam resolução rápida e com mínimas cicatrizes. Em casos de ceratite ulcerativa grave pode haver déficit visual devido à formação de cicatrizes ou a sinéquia anterior e até mesmo perda do bulbo devido a complicações como endoftalmite, glaucoma ou *phthis bulbi* (OLLIVIER, 2003; PRADO et al., 2006; PONTES et al., 2008; TOGNOLI et al., 2009).

Os sinais clínicos observados na ulceração corneana são dor e blefarospasmo, epífora, secreção ocular purulenta e fotofobia. (GELATT, 2003; OLLIVIER, 2003; SLATTER, 2005; PRADO et al., 2006; PONTES et al., 2008). Em seres humanos, dor é o sintoma relatado mais prevalente (KEAY et al., 2009). Assim, o tratamento da ceratite ulcerativa inclui, além de erradicar a infecção, reduzir ou acabar com a destruição da córnea, minimizar cicatrizes e controlar a reação uveal, combater de forma eficaz a dor associada (OLLIVIER, 2003).

A córnea é um dos tecidos mais ricamente inervados do organismo, recebendo densa inervação sensorial do nervo trigêmeo e modesta inervação simpática do gânglio cervical superior, com importantes efeitos neuromodulatórios na cicatrização de lesões (ROZSA e BEUERMAN, 1982; MARFURT et al., 2001). O tratamento da dor ocular pode incluir antiinflamatórios não esteroides (AINES), corticoesteroides ou anestésicos locais tópicos.

Corticoesteroides são comumente utilizados para tratamento de doenças oculares inflamatórias não infecciosas em cães, porém, em lesões no epitélio corneano, o uso de corticosteróides é contra-indicado, devido suas

propriedades imunossupressoras e antiproliferativas, estando associado a uma redução no grau de cicatrização corneana (HENDRIX et al., 2002; WERNER et al., 2008A; WERNER et al., 2008B).

AINES, como o diclofenaco sódico, utilizados topicamente para o controle do desconforto e dor também estão associados com citotoxicidade, presença de infiltrados corneanos periféricos e retardo na cicatrização da córnea devido a rápida produção de metaloproteinases da matriz (HERSH et al, 1990; TABBARA, 2000; HASHIZUME et al, 2001; REVIGLIO et al., 2003).

O alívio da dor ocular pode ser obtido também através do uso de agentes anestésicos tópicos como tetracaína e procaína, porém seu uso prolongado ou aplicações repetidas também promovem efeitos deletérios sobre o epitélio corneano, como inibição da reepitelização corneana, alterações na aderência do filme lacrimal, aumento na permeabilidade corneana e edema que resultarão em perda da transparência corneana (CARNEY et al., 1984; HIGBEE e HAZLETT, 1989; DASS et al., 1988).

Há várias décadas, os opioides são utilizados por via parenteral para promover analgesia. Além do efeito de modulação central da dor, vários estudos apontam que os opioides também promovem ação analgésica quando aplicadas em tecidos e neurônios periféricos, tanto por ação direta no sistema nervoso central quanto por ação em receptores periféricos (STILES et al., 2003; KAPITZKE et al., 2005).

Células nervosas contendo receptores δ -opioide já tinham sido identificados em córnea e limbo de ratos, sendo observada a presença deste receptor na região subepitelial, pericorneana e nas camadas superficiais do epitélio corneano, utilizando anticorpo anti-receptor δ de coelho, analisado por microscópio fluorescente (WENK e HONDA, 1999). Também foram identificados, pela mesma técnica, receptores opiáceos μ e δ em córnea normal de cães observando subjetivamente uma maior prevalência de receptores δ em grandes axônios no estroma anterior, bem como em pequenas fibras no estroma subepitelial e terminações nervosas dentro do epitélio corneano. Receptores μ foram observados em pequena quantidade, estando localizados principalmente no estroma anterior e subepitelial (STILES et al., 2003).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi comparar a ação analgésica e efeitos na cicatrização do sulfato de morfina 1% e diclofenaco sódico 0,1% aplicados topicamente em coelhos com úlcera de córnea superficial induzida.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 24 coelhos, adultos jovens e saudáveis. Os animais foram pré-medicados com midazolam⁹ (0,5mg/kg) por via intramuscular e induzidos e mantidos com 3% de isoflurano¹⁰ diluído em oxigênio por via inalatória. A úlcera de córnea foi induzida no olho esquerdo segundo método proposto por STILES et al. (2003), no qual se utiliza trépano corneal de 7mm para causar uma lesão no centro da córnea, removendo o epitélio da córnea e parte do estroma anterior por raspagem com lâmina de bisturi. A úlcera de córnea superficial foi caracterizada pela posterior coloração com fluoresceína.

Após 24 horas da indução da úlcera de córnea superficial, os animais foram separados em três grupos. Em todos os grupos, os animais recebiam uma gota de colírio de tobramicina 0,3%¹¹ no olho afetado a cada 6 horas, sempre 15 minutos antes do tratamento. No grupo controle (GC, n=8) foi instilada uma gota de cloreto de sódio 0,9%¹², a cada 6 horas; um segundo grupo (GD, n=8) foi tratado com uma gota de diclofenaco sódico 0,1%¹³, a cada 6 horas; e o último grupo (GM, n=8) foi tratado com uma gota de sulfato de morfina 1%¹⁴, a cada 6 horas. A solução de morfina foi preparada a partir de uma solução comercial de morfina 1% sem conservantes, com veículo constituído de cloreto de sódio, ácido clorídrico e água estéril. O pH desta solução foi ajustado para 7,2 adicionando solução tampão de hidróxido de sódio e medido por meio de um pHmetro¹⁵.

⁹ Dormonid® ampolas de 3 ml/15 mg ROCHE – Jaguaré, São Paulo/SP

¹⁰ Isoforine® frasco de 240ml Cristália Produtos químicos farmacêuticos LTDA., São Paulo, Brasil

¹¹ Medicamento Genérico Aché Biossintética Genéricos. São Paulo, Brasil

¹² Solução Fisiológica Equiplax Indústria Farmacêutica. Goiás, Brasil

¹³ Still® Allergan Produtos Farmacêuticos LTDA. São Paulo, Brasil

¹⁴ Dimorf® ampola de 2ml 10mg/ml Cristália Produtos químicos farmacêuticos LTDA., São Paulo, Brasil

¹⁵ pHmetro PG 1800, Gehaka – São Paulo, Brasil

Para avaliar a eficácia dos tratamentos foi mensurada a sensibilidade corneal utilizando estesiômetro¹⁶, pressão intraocular com o uso do tonômetro de Shiotz¹⁷, blefaroespasma através de observação direta e com auxílio de fonte de luz, produção lacrimal¹⁸, hiperemia conjuntival e diâmetro pupilar¹⁹. As avaliações foram realizadas na segunda aplicação do dia, antes e 30 minutos após a aplicação dos colírios, até o dia da completa recuperação da área ulcerada. A área ulcerada foi mensurada diariamente após coloração com fluoresceína e captação de imagem por câmera fotográfica digital e analisada pelo programa Image-Pro Plus²⁰ bem como tempo para completa cicatrização corneana. Utilizou-se uma escala de dor baseada em STASIAK, et. al. (2003), que descreveu uma avaliação algica em coelhos submetidos a procedimentos ortopédicos. Esta escala consiste na avaliação comportamental dos animais. Neste padrão, escores finais entre 0 e 5 caracterizam ausência de dor, entre 6 e 10 dor leve, entre 11 e 15 dor moderada e entre 16 e 21 dor intensa (Figura 3.1.).

Para os dados paramétricos de estesiometria, pressão intraocular, produção lacrimal e diâmetro pupilar, foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste post-hoc de Tukey-Kramer, a partir do programa Statview²¹. Os dados não paramétricos, hiperemia conjuntival e presença de blefaroespasma com e sem fonte de luz, foram comparados pelo teste de qui-quadrado.

¹⁶ Estesiômetro de Cochet-Bonnet - Luneau Ophtalmologie, Paris, França

¹⁷ Tonômetro de Shiotz – Miltex, Nova Jersey, EUA

¹⁸ Teste de Schirmer – Ophthalmos, São Paulo, Brasil

¹⁹ Paquímetro Digital Vonder – São Paulo, Brasil

²⁰ versão 6.0 Medial Cybernetics, Maryland, EUA

²¹ Statview for Windows versão 5.0.1.

CATEGORIA	ESCORE
1. POSIÇÃO DAS ORELHAS	
ERETAS	0
UMA CAÍDA	1
DUAS CAÍDAS	2
2. COMPORTAMENTO	
EXPLORANDO, ALIMENTANDO-SE	0
EXPLORA POUCO, PORÉM SE ALIMENTA	1
NÃO EXPLORA, NÃO SE ALIMENTA	2

Figura 3.1. Escala de dor ocular utilizada para coelhos com úlcera de córnea superficial induzida.

3.5. RESULTADOS

A cicatrização da córnea de todos os animais ocorreu até 120 horas após ter sido induzida a lesão (Figura 3.2.). Foi observado, porém, um atraso na cicatrização da córnea nos coelhos que receberam diclofenaco comparado aos demais grupos 72 horas após a lesão, quando 50% (4/8) dos animais do GM ($p=0,0047$) e 37,5% (3/8) do GC ($p=0,0003$) não apresentavam coloração representativa por fluoresceína, enquanto todos os animais do GD possuíam (FIGURA 3.1.). O diâmetro da lesão do GM foi significativamente menor que GD no quarto dia de tratamento (Figura 3.3.).

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
GM	8	8	4	2	0
GD	8	8	8	3	0
GC	8	8	5	3	0

Figura 3.2. – Número de animais positivos para coloração de Fluoresceína em coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)

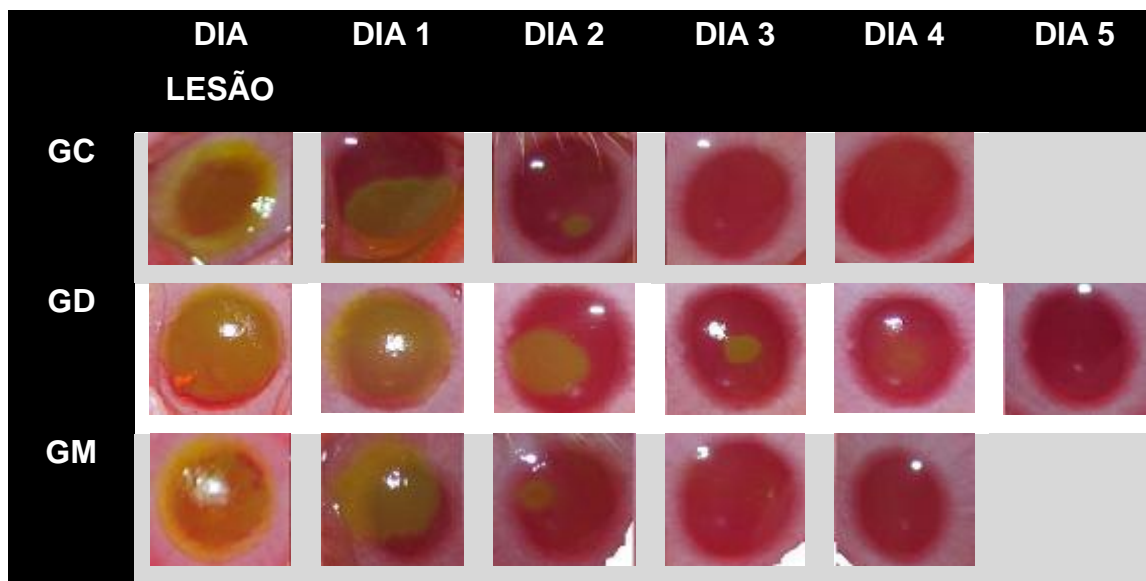


Figura 3.3. Olhos com úlceras de córnea superficial de 7mm induzidas e coradas com fluoresceína (Dia 0), e a evolução durante o tratamento tópico com cloreto de sódio 0,9% (GC) diclofenaco sódico 0,1% (GD) e sulfato de morfina 1% (GM). Evolução do dia 1 ao dia 5 de tratamento.

Os animais tratados com diclofenaco apresentaram maior variação comportamental no dia 1, antes e após a administração do colírio ($p=0,0008$ entre GM e GD e $p=0,0008$ entre GD e GC). No dia 2 os animais tratados com diclofenaco também apresentaram maior variação comportamental ($p=0,0058$ entre GD e GC e $p=0,0339$ entre GD e GM). O grupo controle apresentou as menores variações comportamentais (Figura 3.7 e 3.8.).

Avaliando-se isoladamente a estesiometria, observa-se que no dia 1 houve uma sensibilidade maior dos animais do GM em relação aos demais grupos trinta minutos após aplicação do colírio (Figura 3.4.).

Houve redução na pressão intraocular no dia 2 momento 0 entre o GM e GD (Figura 3.9.) e no dia 1 momento 30 em relação ao GM e GC e GM e GD (FIGURA3.10.).

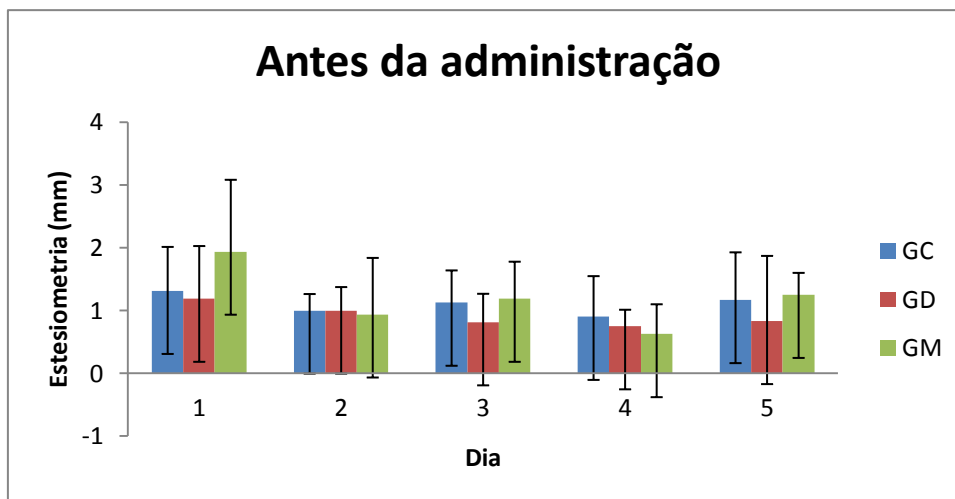
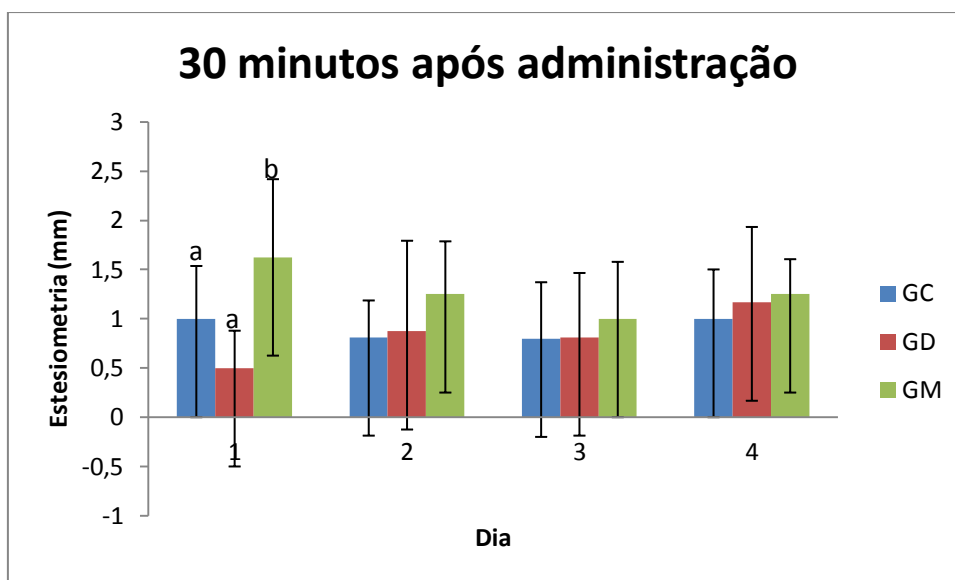
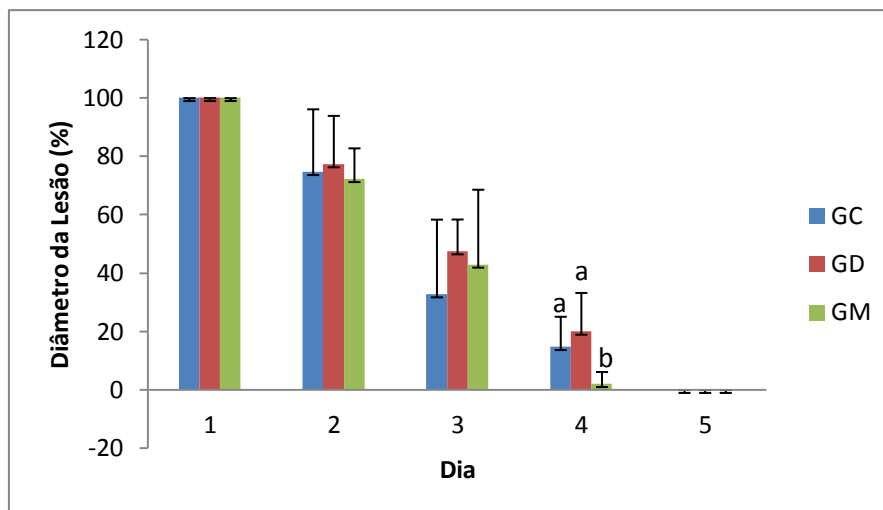


Figura 3.4. – Valores da sensibilidade da córnea aferida por estesiometro de CochetBonnet para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)



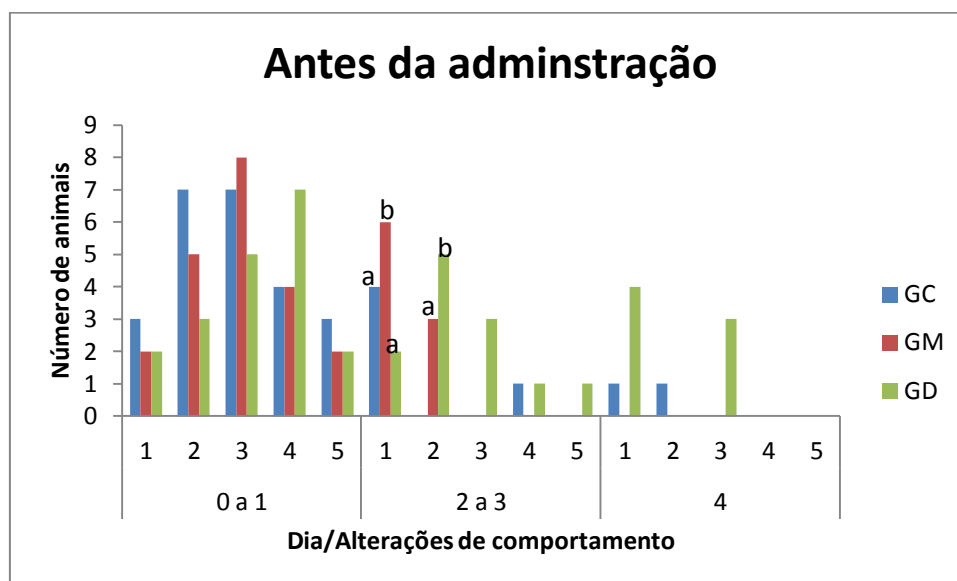
Nota: letras diferentes valores com significância estatística ($p=0,0202$) entre GM e GD, ($p=0,0905$) entre GM e GC.

Figura 3.5. – Valores da sensibilidade da córnea aferida por estesiometro de CochetBonnet para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)



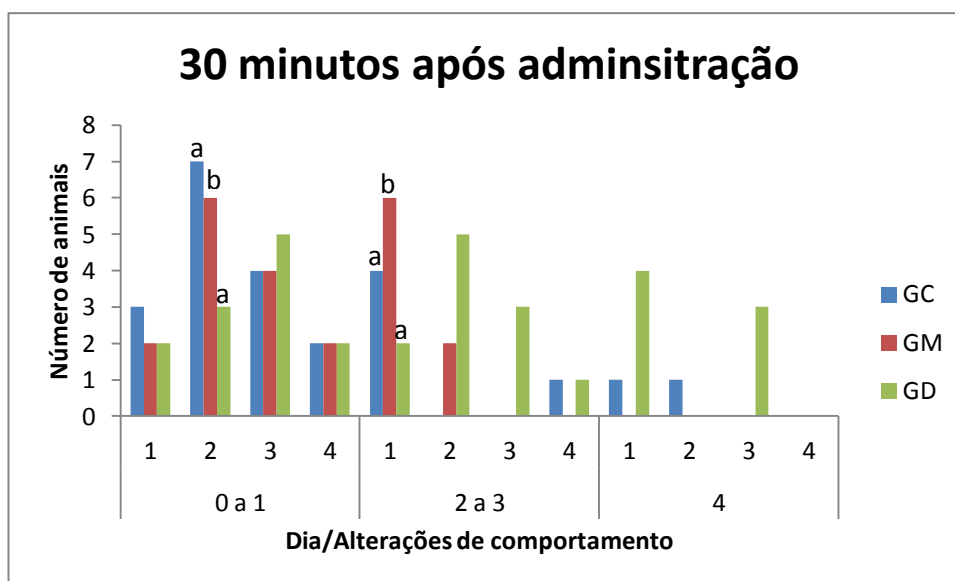
Nota: letras diferentes valores com significância estatística ($p=0,0202$) entre GM e GD, ($p=0,0905$) entre GM e GC.

FIGURA 3.6. - Valores do diâmetro da lesão analisado pelo programa Image-Pro Plus para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)



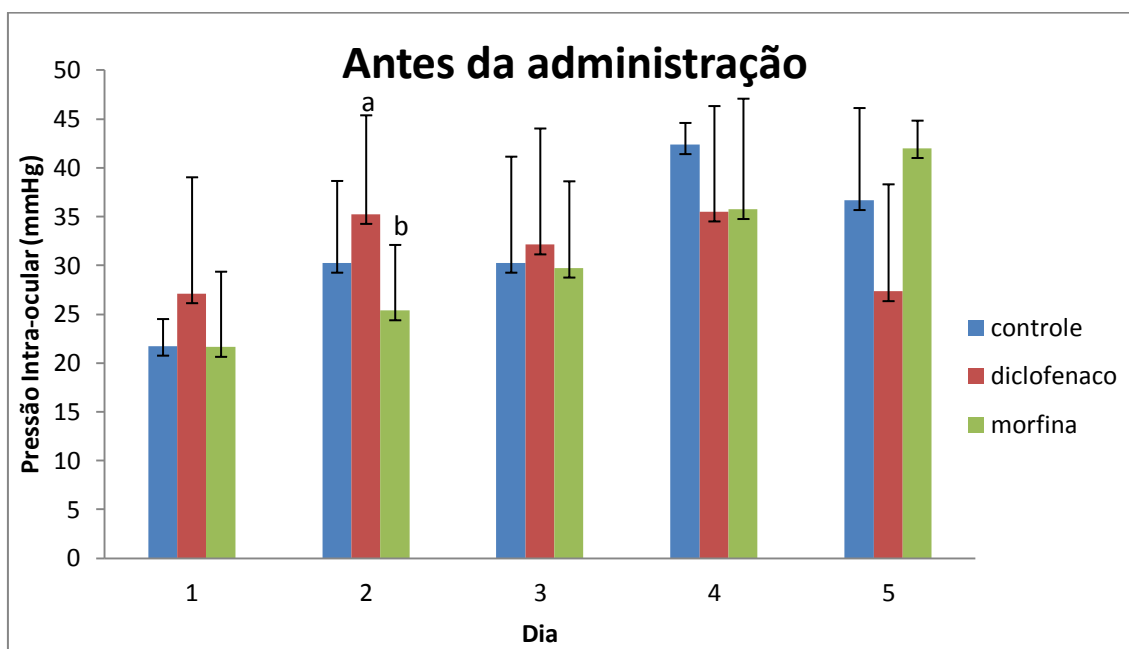
Nota: Nota: letras diferentes valores com significância estatística ($p=0,0011$) entre GM e GD, ($p=0,0008$) entre GD e GC dia 1; ($p=0,0058$) entre GD e GC dia 2.

FIGURA 3.7. - Valores para escala de alteração comportamental para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)



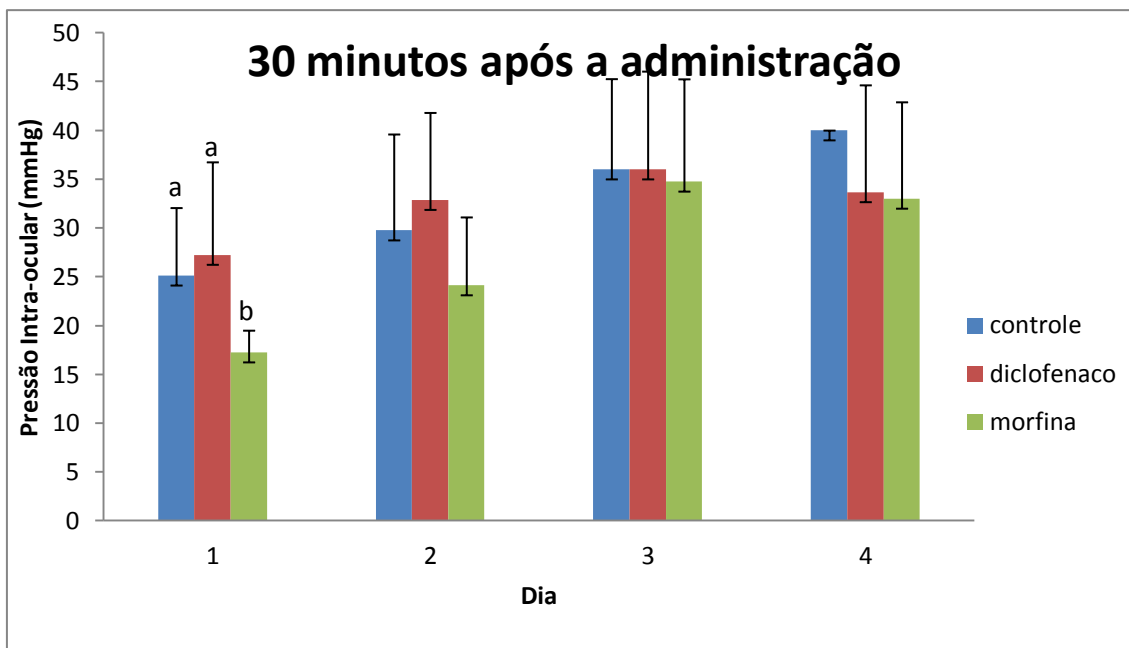
Nota: Nota: letras diferentes valores com significância estatística ($p=0,0011$) entre GM e GD, ($p=0,0008$) entre GD e GC dia 1; ($p=0,0058$) entre GD e GC e ($p=0,0339$) entre GD e GM dia 2.

FIGURA 3.8. - Valores para escala de alteração comportamental para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)



Nota: letras diferentes valores com significância estatística ($p<0,05$) entre GM e GC, ($p<0,05$) entre GC e GD.

Figura 3.9. – Valores da pressão intra-ocular avaliada por tonômetro de Schiotz para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)



Nota: letras diferentes valores com significância estatística ($p < 0,05$) entre GM e GC, ($p < 0,05$) entre GC e GD.

Figura 3.10. – Valores da pressão intra-ocular avaliada por tonômetro de Schiøtz para coelhos tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); diclofenaco sódico 0,1% (GD); sulfato de morfina 1% (GM)

3.6. DISCUSSÃO

O método de indução de úlcera de córnea superficial utilizado provocou apenas uma dor leve nos coelhos. O próprio estresse promovido pela manipulação da aplicação e avaliação de dor já promoveu um aumento nos escores obtidos na escala utilizada, exceto pelo grupo que recebeu morfina, quando não foram observados sinais evidentes do estresse de manipulação.

Os receptores opioides localizam-se principalmente no sistema nervoso central, porém em presença de inflamação esses receptores podem se expressar no sistema nervoso periférico, promovendo analgesia localizada (RIBEIRO et al., 2002; STILES et al., 2003). Além do efeito de modulação da dor, vários estudos apontam que os opioides possuem ação antiinflamatória nos tecidos e neurônios periféricos, tanto por ação direta no sistema nervoso central quanto por ação em receptores periféricos (STEIN, 1993; KAPITZKE et al., 2005).

Dois estudos já haviam demonstrado que a solução tópica de morfina a 0,5% e 1% possui efeito analgésico na córnea ulcerada de coelhos, cães e seres humanos (PEYMAN et al., 1994, STILES et al., 2003). Optou-se, no presente estudo, por avaliar o efeito analgésico 30 minutos após a aplicação, o que pode não ter refletido o melhor resultado analgésico do colírio de morfina, devido uma demora no seu início de ação ou por uma irritação ocular causada diretamente pelo produto ou veículo, pois quando foi analisada exclusivamente a estesiometria, a reação ao estímulo doloroso era superior após sua aplicação. A morfina utilizada como colírio no presente estudo provém de uma formulação comercial para uso injetável, sem conservantes, porém contendo como veículo cloreto de sódio, ácido clorídrico e água para injeção. Esta solução teve seu pH ajustado, adicionado-se solução tampão de hidróxido de sódio, porém, mesmo com o ajuste do pH observou-se efeito irritativo logo após sua aplicação.

Administrando-se morfina localmente em pós-operatório de cirurgias de joelho em humanos, observou-se que o escore de dor reduziu significativamente, provavelmente por ativação de receptores locais, confirmando estudos anteriores que demonstram que receptor e opioide estão ativos na antinocicepção em tecidos inflamados ou em situações de estresse (STEIN et al., 1988; STEIN et al., 1989; STEIN et al., 1991).

Em estudo realizado para identificar a presença de receptores opiáceos em córnea normal de cães e os efeitos do uso de solução de sulfato de morfina 1% na cicatrização e redução da dor em cães com úlcera de córnea, observou-se que, após 30 minutos da aplicação da morfina já se observava analgesia. Em cortes histológicos não houve diferenças entre o grupo tratado com morfina e o grupo controle (STILES et al., 2003). Os níveis semelhantes de dor observados entre o grupo controle e o grupo tratado com morfina nos dias subsequentes de tratamento, inclusive inferiores aos inferidos com os animais tratados com diclofenaco, sugerem que apenas a lubrificação da córnea já promove um controle algico.

Dois diferentes estudos utilizando coelhos mostraram que a instilação tópica de 100 µg morfina também produziu diminuição da pressão intraocular. Estes efeitos estão ligados à ativação de receptores μ intraoculares, os quais

desencadeiam a inibição da síntese de óxido nítrico, substância fundamental na regulação do fluxo sanguíneo intraocular (BONFIGLIO et al., 2006; DORTCH-CARNES e RUSSEL, 2006). No presente estudo, também observou-se redução significativa na pressão intra ocular, como relatado nos anteriores quando comparado ao uso de diclofenaco.

Antiinflamatórios não esteroidais têm um efeito inibitório na cicatrização de vários tecidos incluindo a córnea e o tratamento longo com esses medicamentos levam a uma epitelopatia neurotrófica aumento do tempo de cicatrização (REVIGLIO et al., 2003). O retardo na cicatrização da córnea deve ter sido o responsável por ter sido observado maiores escores de dor nos animais tratados com diclofenaco no quarto dia de tratamento.

3.7. CONCLUSÃO

O tratamento de coelhos com úlcera de córnea superficial com colírio de morfina 1% produz uma leve irritação ocular após a administração e apresenta um poder analgésico semelhante ao tratamento com solução fisiológica e com diclofenaco, porém não causa atraso no processo de cicatrização da córnea.

3.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONFIGLIO, V.; BUCOLO, C.; CAMILLIERI, G.; DRAGO, F. Possible involvement of nitric oxide in morphine-induced miosis and reduction of intraocular pressure in rabbits. **European Journal of Pharmacology**. v. 534, p. 227-232, 2006.

CARNEY, L.G.; O'LEARY, D.J.; MILLODOT, M. Effect of topical anesthesia on corneal epithelial fragility. **Int Ophthalmol**. v.7, p.71-73, 1984.

DASS, B.A.; SOONG, H.K.; LEE, B. Effects of proparacaine on actin cytoskeleton of corneal epithelium. **Journal of Ocular Pharmacology**. v. 4, p.187-194, 1988.

DORTCH-CARNES, J.; RUSSELL, K.R. Morphine-induced reduction of intraocular pressure and pupil diameter: role of nitric oxide. *Pharmacology*, v.77, p.17-24, 2006.

GELATT, K.N. **Doenças e cirurgia da córnea e esclera do cão**. In: GELATT, K.N. Manual de Oftalmologia Veterinária. 1.ed. Editora Manole Ltda: São Paulo, 2003.

HASHIZUME, N.; SAIKA, S.; OKADA, Y.; MIYAMOTO, T.; SHIMIZU, K.; OHNISHI, Y. Effects of antiinflammatory drugs on migration of the rabbit corneal epithelium. **Journal Cataract Refract Surg**. v. 27, p.1499-1502, 2001.

HENDRIX, D.V.H.; WARD, D.A.; BARNHILL, M.A. Effects of anti-inflammatory drugs and preservatives on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells In tissue culture. **Veterinary Ophthalmology**. v.5, p.127-135, 2002.

HERSH, P.S.; RICE, B.A.; BAER, J.C.; WELLS, P.A.; LYNCH, S.E.; MCGULGAN, L.J.; FOSTER, C.S. Topical nonsteroidal agents and corneal wound healing. **Archives of Ophthalmology**. v. 108, p.577-583, 1990.

HIGBEE, R.G.; HAZLETT, L.D. Topical ocular anesthetics affect epithelial cytoskeletal proteins of wounded cornea. **Journal of Ocular Pharmacology**. v.5, p.241-253, 1989.

KAPITZKE, D.; VETTER, I.; CABOT, P.J. Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v.1, p.279-297, 2005.

KEAY, L.; EDWARDS, K.; STAPLETON, F. Signs, symptoms, and comorbidities in contact lens – related microbial keratitis. **Optometry and Vision Science**. v.86, p.803-809, 2009.

MARFURT, C.F.; MURPHY, C.J.; FLORCZAK, J.L. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 42, p.2244-2251, 2001.

OLLIVIER, F.J.; Bacterial corneal diseases in dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v.18, p.193-198, 2003.

PEYMAN, G.A.; RAHIMY, M.H.; FERNANDES, M.L. Effects of morphine on corneal sensitivity and epithelial wound healing: implications for topical ophthalmic analgesia. **British Journal of Ophthalmology**. v.78, p.138-141, 1994.

PONTES, K.C.S.; BORGES, A.P.B.; DUARTE, T.S.; MORATO, G.L.; ZAVAN, V.; ELEOTÉRIO, R.B.; CARLO, E.C. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea em coelhos – aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.1069-1074, 2008.

PRADO, M.R.; BRITO, E.H.S.; GIRÃO, M.D.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Identification and antimicrobial susceptibility of bacterial isolated from corneal ulcers of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, p.1024-1029, 2006.

REVIGLIO, V.E.; RANA, T.S.; LI, Q.J.; ASHRAF, M.F., DALY, M.K.; O´BRIEN, T.P. Effects of topical nonsteroidal antiinflammatory drugs on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. **Journal Cataract Refract Surg**. v. 29, p.989-997, 2003.

RIBEIRO, S; SCHMIDT, A.P., SCHMIDT, S.R.G. O uso de opioides no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.52, p.644-651, 2002.

ROSZA, A.J.; BEUERMAN, R.W. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. **Pain**. v.14, p.105-120, 1982.

SLATTER, **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3.ed. Editora Roca, 2005.

STASIAK, K.L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P.W.; VANDEWOUDE, S. **Species-Specific assessment of pain in laboratory animals**. Journal of the American Association for Laboratory Animals Science. v.42, n.4, p. 13-20, 2003.

STEIN, C.; MILLAN M.J.; YASSOURIDIS A.; HERZ A. **Antinociceptive: effects of μ and λ agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism**. European Journal of Pharmacology. v.155, p. 255-264, 1988.

STEIN C.; MILLAN M.J.J.; SHIPPENBERG T.S.; PETER K.; HERZ A. **Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation: evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors**. Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics. v.248, p. 1269-1275, 1989.

STEIN C.; COMISEL K.; HAIMERL E.; YASSOURIDIS A.; LEHRBERGER K.; HERZ A. et al. **Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery**. The New England Journal of Medicine. v.325, p. 1123-1126, 1991.

STEIN, C. Peripheral Mechanisms of Opioid Analgesia. **Anesthesia and Analgesia**. v.76, p.182–191, 1993.

STILES, J.; HONDA, C.N.; KROHNE, S.G.; KAZACOS, E.A. Effect of topical administration of 1% morphine sulfate solution on signs of pain and corneal wound healing in dogs. **American Journal Veterinary Research.** v.64, n.7, p.813-818, 2003.

TABBARA, K.F. Peripheral corneal infiltrates following oral diclofenac administration. **Archives of Ophthalmology.** v. 118, 2000.

TOGNOLI, G.K.; OLSSON, D.C.; MARTINS, D.B.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; SALBEGO, F.Z.; DE OLIVEIRA, G.K.; BRAGA, F.V.A.; RAISER, A.G.; DEZENGRINI, R.; DA CRUZ, F.S.F.; DE CASTRO, M.B.; ROSA, M.C.; CARREGARO, A.B.; PIPPI, N.L. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural.** v.39, p.148-155, 2009.

WENK, H.N.; HONDA, C.N. Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. **The Journal of Comparative Neurology.** v.408, p. 567-579, 1999.

WERNER, A.; BRAUN, M.; KIETZMANN, M. Isolation and cultivation of canine corneal cells for *in vitro* studies on the anti-inflammatory effects of dexamethasone. **Veterinary Ophthalmology.** v.11, n. 2, p.67-74, 2008.

WERNER, A.; BRAUN, M.; REICHL, S.; KIETZMAN, M. Establishing and functional testing of a canine corneal construct. **Veterinary Ophthalmology.** v.11,n. 5, p.280-289, 2008.

4. AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE SOLUÇÃO DE SULFATO DE MORFINA 1% EM OLHOS SAUDÁVEIS DE CÃES

4.1. RESUMO

A córnea é um dos tecidos mais ricamente inervados do organismo. Receptores opioides já foram detectados na córnea, sendo o uso tópico de opioides uma alternativa para promover a analgesia no tratamento de úlceras de córnea, sem prejudicar a cicatrização. Este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade corneana do uso de solução de sulfato de morfina 1% na córnea íntegra de cães. Dez cães sem lesão ocular foram utilizados, considerando o olho direito como grupo controle e o olho esquerdo o grupo morfina. Todos os vinte olhos receberam primeiramente uma gota de tobramicina 0,3% e, 15 minutos depois, o grupo controle recebeu uma gota de solução fisiológica 0,9% (GC), e o grupo morfina uma gota de solução de sulfato de morfina 1% com o pH corrigido para 7,2 (GM). Os parâmetros avaliados foram: tonometria, estesiometria, teste lacrimal de Schirmer, diâmetro pupilar, hiperemia conjuntival e presença de blefaroespasma com e sem fonte de luz. As avaliações ocorreram antes das aplicações e nos momentos 10, 20, 30, 60 e 240 minutos após a instilação do último colírio. Avaliou-se também o grau de dor segundo a escala de dor adaptada de STASIAK et al. (2003). Foi realizada análise de variância (ANOVA) para os testes paramétricos, com comparação das médias pelo teste de Tukey-Kramer. A hiperemia e blefaroespasma foram avaliados pelo teste de qui-quadrado, bem como a escala de dor. No momento de avaliação 240 minutos, a morfina causou uma leve redução da pressão intra-ocular.

Palavras-chave: córnea, morfina, cães, escala de dor

4.2. ABSTRACT

The cornea is one of the most highly innervated tissues in the organism. Opioid receptors have already been detected in the cornea, so the topical use of opioids is presented as an alternative to promote analgesia in the treatment of ulcerated corneas, with no damage in cicatrization. This research aimed to evaluate the corneal sensitivity of the 1% morphine sulfate solution in the intact cornea of dogs. Ten dogs with no ocular lesions were used, considering the right eye as the control group and the left eye as the morphine group. All the twenty eyes received initially one drop of 0,3% tobramycin and, 15 minutes later, the control group received one drop of 0,9% physiological solution (CG), and the morphine group one drop of 1% morphine sulfate solution with the pH corrected for 7.2 (MG). The parameters evaluated were: tonometry, esthesiometry, Schirmer lacrimation test, pupil diameter, conjunctival hyperemia and blepharospasm with and without light source. The evaluations happened before the last collyrium. It was also evaluated the pain level according to the adapted STASIAK et al. (2003) pain scale. It was realized variance analysis (ANOVA) for the parametric tests, comparing the means by the Tukey-Kramer test. The hyperemia and the blepharospasm were evaluated by the chi-square test, as well as the pain scale. In the moment of evaluation 240 minutes, morphine caused light reduction in the intraocular pressure.

Keywords: cornea, morphine, dogs, pain scale

4.3. INTRODUÇÃO

A córnea é um dos tecidos mais ricamente nervados do organismo, recebendo densa inervação sensorial do nervo trigêmeo e modesta inervação simpática do gânglio cervical superior, com importantes efeitos neuromodulatórios na cicatrização de lesões (ROZSA e BEUERMAN, 1982; MARFURT et al., 2001).

O epitélio corneano íntegro é uma barreira contra bactérias invasoras. A úlcera de córnea caracteriza-se por perda de epitélio corneal e ativação de fibroblastos presentes no estroma corneano, o que leva a um inchaço no estroma e migração de células inflamatórias com subsequente perda da integridade e transparência corneana (PRADO et al., 2006).

A ceratite ulcerativa é uma das doenças oculares mais comuns e importantes em animais domésticos, principalmente nos cães, tendo origem usualmente traumática e rápida contaminação bacteriana. Leva à opacidade ocular, causando dor e baixa de acuidade visual nas diferentes espécies, inclusive nos seres humanos (GELATT, 2003; OLLIVIER, 2003; MAIDANA et al., 2005; SLATTER, 2005; PRADO et al., 2006; PONTES et al., 2008; WERNER et al., 2008A; WERNER et al., 2008B; KIM et al., 2009; KEAY et al., 2009).

O tratamento da ceratite ulcerativa inclui, além de erradicar a infecção, reduzir ou acabar com a destruição da córnea, minimizar cicatrizes e controlar a reação uveal e a dor associada (OLLIVIER, 2003). O uso de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais tópicos, efetivos no controle da dor, podem estar associados a um prejuízo na cicatrização da córnea (HENDRIX et al., 2002; WERNER et al., 2008A; WERNER et al., 2008B).

Os receptores opioides localizam-se principalmente no sistema nervoso central, porém em presença de inflamação esses receptores podem se expressar no sistema nervoso periférico, abrindo novas perspectivas para o uso tópico dessas drogas, auxiliando no controle da dor e na reparação do tecido corneano (RIBEIRO et al., 2002). Em córnea íntegra, porém, não há quantidade suficiente de receptores opioides para que seu uso local promova efeitos analgésicos. Neste caso, ações irritantes ao tecido corneano e conjuntiva promovendo inflamação e dor poderão ser mais pronunciados e assim percebidos.

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos analgésicos e irritantes da solução de sulfato de morfina 1% administrada em cães com córneas íntegras.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Dez cães de raças, idades e tamanhos diferentes, saudáveis e com córneas íntegras foram utilizados. Todos os animais foram submetidos ao mesmo tratamento, sendo que o olho direito era considerado o grupo controle e o olho esquerdo o grupo morfina.

A solução de morfina foi preparada a partir de uma solução comercial de morfina 1%²² sem conservantes, com excipiente constituído de cloreto de sódio, ácido clorídrico e água estéril, com o pH ajustado para 7,2 adicionando solução tampão de hidróxido de sódio e medido por meio de um pHmetro²³.

Em todos os olhos foi administrada uma gota de colírio de tobramicina 0,3%²⁴. Após 15 minutos, no olho direito foi administrada uma gota de solução fisiológica 0,9%²⁵ e no olho esquerdo uma gota de solução de sulfato de morfina 1%.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: sensibilidade corneal utilizando estesiômetro²⁶, pressão intraocular com o uso do tonômetro de Shiotz²⁷, blefaroespasma através de observação direta e com auxílio de fonte de luz, produção lacrimal²⁸, hiperemia conjuntival e diâmetro pupilar²⁹. As avaliações foram feitas antes da aplicação dos colírios e nos momentos 10, 20, 30, 60 e 240 minutos após a instilação do último colírio, com exceção do teste lacrimal de Schirmer que foi realizado antes da administração dos colírios e 30 minutos após.

Criou-se uma escala comportamental para avaliar efeito da solução de sulfato de morfina em córnea íntegra. Esta escala consiste na avaliação da comportamental dos animais sendo estes dados realizado teste de Qui-Quadrado (Figura4.1.).

Para os dados paramétricos de estesiometria, pressão intraocular, produção lacrimal e diâmetro pupilar, foi realizada análise de variância e as

²² Dimorf® ampola de 2ml 10mg/ml Cristália Produtos químicos farmacêuticos LTDA., São Paulo, Brasil

²³ pHmetro PG 1800, Gehaka – São Paulo, Brasil

²⁴ Medicamento Genérico Aché Biossintética Genéricos. São Paulo, Brasil

²⁵ Solução Fisiológica EquiPLEX Indústria Farmacêutica. Goiás, Brasil

²⁶ Estesiometro de Cochet-Bonnet - Luneau Ophtalmologie, Paris, França

²⁷ Tonômetro de Shiotz – Miltext, Nova Jersey, EUA

²⁸ Teste de Schirmer – Ophthalmos, São Paulo, Brasil

²⁹ Paquímetro Digital Vonder – São Paulo, Brasil

médias comparadas pelo teste post-hoc de Tukey-Kramer, a partir do programa Statview³⁰. Os dados não paramétricos, escala de dor, hiperemia conjuntival e presença de blefaroespasma com e sem fonte de luz, foram comparados pelo teste de qui-quadrado.

CATEGORIA	ESCORE
1. PRURIDO OCULAR	
AUSENTE	0
MODERADO	+
INTENSO	++
2. COMPORTAMENTO	
NORMAL	0
AGITADO	+
APÁTICO	++

Figura 4.1. Parâmetros e valores atribuídos na escala comportamental adotada para avaliação da dor ocular em cães

4.5. RESULTADOS

A avaliação da dor através de escala criada para avaliar o comportamento de dor em pacientes sem úlcera de córnea demonstrou que não houve diferença estatística entre o olho controle e o olho morfina (Figura 4.2.).

Não houve diferença estatística para diâmetro pupilar, teste lacrimal de Schirmer e para os valores de estesiometria (Figura 4.3.; 4.4.;4.5)

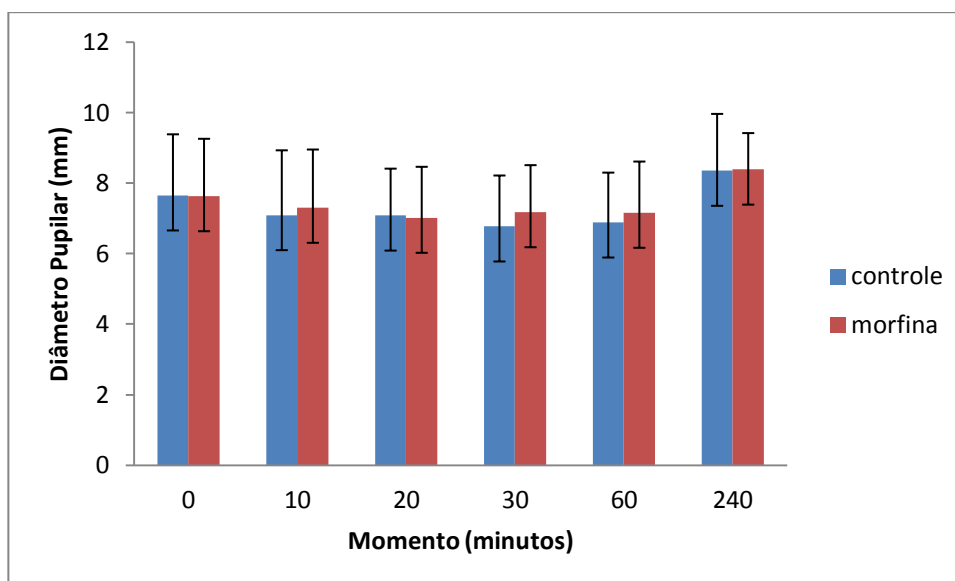
No momento 240 minutos houve diferença estatística para a pressão introcular ($p=0,0139$) (Figura 4.6.).

³⁰ Statview for Windows versão 5.0.1.

Animal	Momento 0	Momento 10	Momento 20	Momento 30	Momento 60
1	+	+	+	+	+
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	+	+	+	+	+
5	+	+	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	++	++	++	++	++
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0

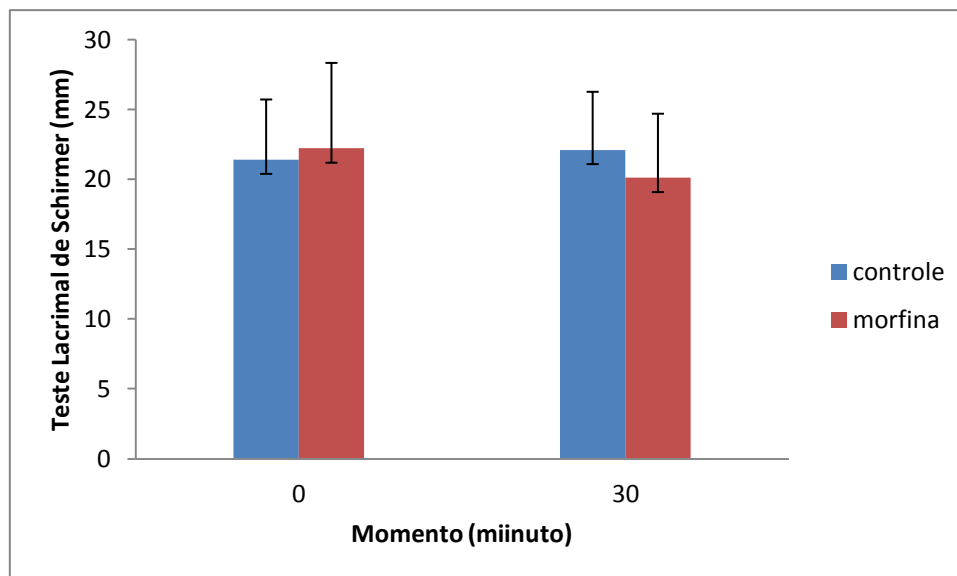
Nota: não há diferença estatística entre os animais.

Figura 4.2.: Valores para escala de dor para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM)



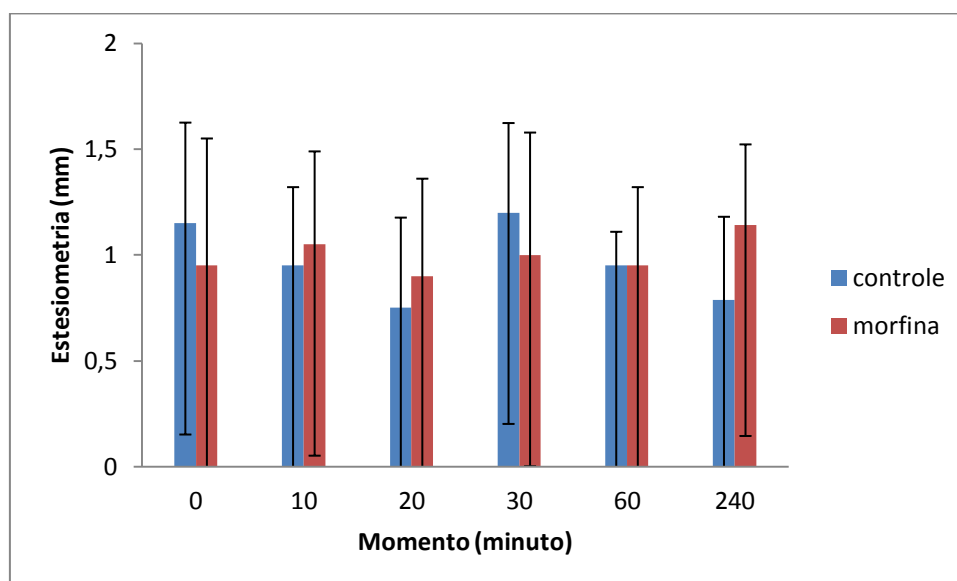
Nota: não há diferença estatística entre os animais.

Figura 4.3.: Valores para diâmetro pupilar para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM)



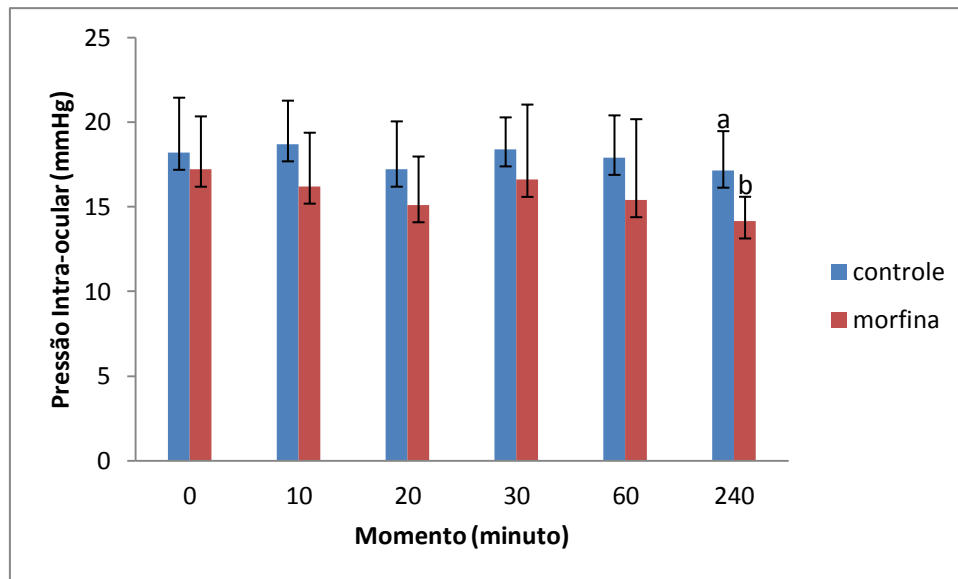
Nota: não há diferença estatística entre os animais.

Figura 4.4.: Valores para teste lacrimal de Schirmer para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM)



Nota: não há diferença estatística entre os animais.

Figura 4.5.: Valores para estesiometria para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM)



Nota: letras diferentes valores com significância estatística ($p=0,00139$) entre GM e GC.

Figura 4.6.: Valores para pressão intraocular para cães tratados com cloreto de sódio 0,9% (GC); sulfato de morfina 1% (GM)

4.6. DISCUSSÃO

Trabalhos com uso de morfina topicamente para alívio da dor em pacientes com úlcera de córnea ainda são escassos tanto na literatura humana como na veterinária. A solução tópica de morfina a 0,5% e 1% possui efeito analgésico na córnea ulcerada de coelhos, cães e seres humanos (Peyman et al., 1994, STILES et al., 2003). O uso de morfina tópica em coelhos com lesão de córnea superficial induzida mostrou valores levemente superiores ao tratamento com o diclofenaco e solução fisiológica (Capítulo 2), porém em córnea íntegra não se observa efeito analgésico.

Os opioides parecem ter ação na homeostase e renovação celular do epitélio corneano, tendo os peptídeos opioides endógenos papel importante na reparação de lesões corneanas (ZAGON et al., 1998).

Receptores opioides, assim como neuropeptídios e outras proteínas, são sintetizados em gânglios da raiz dorsal, sendo carregados por via axonal para terminais centrais e periféricos (STEIN et al., 2001). A expressão destes receptores opioides pode ser modulada por reação inflamatória próxima a terminais de neurônios aferentes primários (STEIN et al., 2001), como

observado no primeiro capítulo. O transporte axonal do receptor opioide é aumentado devido à liberação de interleucina 1β (IL- 1β), levando a um aumento na eficácia do agonista em nervos periféricos (STILES et al., 2003). Por não haver lesão ocular, neste estudo, a quantidade de receptores é diminuída, não se observando efeito analgésico em córnea [íntegra].

Assim como observado neste estudo, o sulfato de morfina, mesmo atenuando a inflamação e a hiperalgesia de córneas ulceradas, não tem nenhum efeito quando aplicada em córnea saudável de ratos e cães (PEYMAN, et. al., 1994; WENK, et. al., 2003).

Através do uso de escala comportamental e estesiometria, não observou-se irritação ocular após a instilação da solução de morfina. Uma irritação pode ser explicada pela liberação de histamina, ou pela variação no pH decorrente do veículo utilizado nas apresentações parenterais da morfina (TRESCOT et al., 2008).

A irritação ocular promovida pela instilação de solução de sulfato de morfina, aumentando o escore de dor em cães, reforça a teoria de não se ter observado escores de dor menor na avaliação de coelhos tratados com solução tópica de sulfato de morfina ocular, devido a efeitos adversos tópicos da solução utilizada (capítulo 2). Assim como o sulfato de morfina com pH neutro, alguns medicamentos utilizados topicamente no olho podem promover irritação logo após sua instilação. O colírio de proparacaína e principalmente o de tetracaína causam de leve a moderada hiperemia de conjuntiva e blefaroespasmos logo após a instilação em cães e coelhos, sendo que esta se tornava novamente normocrômica pouco tempo depois (AMARAL, 2005; PARCHEN et al., 2011).

A escala utilizada para avaliação comportamental de desconforto e dor ocular, incluindo na análise blefaroespasmos e hiperemia, oferece uma melhor avaliação do efeito alérgico do que quando se avalia exclusivamente a resposta direta ao estímulo doloroso provocado pelo estesiômetro de Cochet-Bonnet.

4.7. CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo que a solução de sulfato de morfina 1% não promove efeito analgésico quando administrada em córnea íntegra de cães e não está associada a efeitos irritativos no olho e anexos logo após a instilação e demonstra a necessidade do uso de escalas de avaliação comportamental para avaliar a real intensidade de dor que os animais apresentam.

4.8. REFERENCIAS

AMARAL, A.V.C. Estudo Clínico e Histológico das pálpebras, conjuntiva e córnea híidas submetidas a tratamento local com soluções anestésicas em coelho. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2005.

GELATT, K.N. **Doenças e cirurgia da córnea e esclera do cão.** In: GELATT, K.N. Manual de Oftalmologia Veterinária. 1.ed. Editora Manole Ltda: São Paulo, 2003.

GELATT, K.N. **Glaucoma do cão.** In: GELATT, K.N. Manual de Oftalmologia Veterinária. 1.ed. Editora Manole Ltda: São Paulo, 2003.

GÓRNIK, S.L. **Hipnoanalgésicos.** In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 3.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

HENDRIX, D.V.H.; WARD, D.A.; BARNHILL, M.A. Effects of anti-inflammatory drugs and preservatives on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells In tissue culture. **Veterinary Ophthalmology.** v.5, p.127-135, 2002.

KEAY, L.; EDWARDS, K.; STAPLETON, F. Signs, symptoms, and comorbidities in contact lens – related microbial keratitis. **Optometry and Vision Science**. v.86, p.803-809, 2009.

KIM, J.Y.; CHOI, Y.M.; JEONG, S.W.; WILLIAMS, D.L. Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BATM) on uncomplicated canine corneal erosion. **Veterinary Ophthalmology**. v.12, p.36-42, 2009.

MAIDANA, E.; GONZÁLEZ, R.; MELO JÚNIOR, L.A.S.; DE SOUZA, L.B. Ceratite infecciosa em crianças: estudo microbiológico e epidemiológico em um hospital universitário de Assunção – Paraguai. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**. v.68, p.828-832, 2005.

MARFURT, C.F.; MURPHY, C.J.; FLORCZAK, J.L. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 42, p.2244-2251, 2001.

OLLIVIER, F.J.; Bacterial corneal diseases in dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v.18, p.193-198, 2003.

PARCHEN, H.D.; IZAR, M.I., BRANCO, P.S.; LACOWICZ, C.; SANO, D.H.; BELO, C.E.P., VILANI, R.G.D'O.C. Ophthalmic and anesthetic evaluation of topical 1% tetracaine and 0,5% proparacaine in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.63, n. 6, p.1337-1344, 2011.

PEYMAN, G.A.; RAHIMY, M.H.; FERNANDES, M.L. Effects of morphine on corneal sensitivity and epithelial wound healing: implications for topical ophthalmic analgesia. **British Journal of Ophthalmology**. v.78, p.138-141, 1994.

PONTES, K.C.S.; BORGES, A.P.B.; DUARTE, T.S.; MORATO, G.L.; ZAVAN, V.; ELEOTÉRIO, R.B.; CARLO, E.C. Membrana amniótica canina utilizada como bandagem em úlcera superficial de córnea em coelhos – aspectos clínicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.1069-1074, 2008.

PRADO, M.R.; BRITO, E.H.S.; GIRÃO, M.D.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Identification and antimicrobial susceptibility of bacterial isolated from corneal ulcers of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, p.1024-1029, 2006.

RIBEIRO, S; SCHMIDT, A.P., SCHMIDT, S.R.G. O uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.52, p.644-651, 2002.

ROZSA, A.J.; BEUERMAN, R.W. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. **Pain**. v.14, p.105-120, 1982.

SLATTER, **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3.ed. Editora Roca, 2005.

STASIAK, K.L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P.W.; VANDEWOUDE, S. **Species-Specific assessment of pain in laboratory animals**. Journal of the American Association for Laboratory Animals Science. v.42, n.4, p. 13-20, 2003.

STEIN C.; MACHELSKA, H.; SCHÄFER, M.. **Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids**. Z Rheumatol. v.60, p. 416-424, 2001.

STILES, J.; HONDA, C.N.; KROHNE, S.G.; KAZACOS, E.A. Effect of topical administration of 1% morphine sulfate solution on signs of pain and corneal wound healing in dogs. **American Journal Veterinary Research**. v.64, n.7, p.813-818, 2003.

TRESCOT, A.M.; DATTA, S.; LEE, M; HANSEN, H. Opioid Pharmacology. **Pain Physician.** v.11, p.133-153, 2008

WENK, H. N., NANNENGA, M. N. and HONDA, C. N. Effect of morphine sulphate eye drops on hyperalgesia in the rat cornea. **Pain.** v. 105, p. 455-465, 2003.

WERNER, A.; BRAUN, M.; KIETZMANN, M. Isolation and cultivation of canine corneal cells for *in vitro* studies on the anti-inflammatory effects of dexamethasone. **Veterinary Ophthalmology.** v.11, n. 2, p.67-74, 2008.

WERNER, A.; BRAUN, M.; REICHL, S.; KIETZMAN, M. Establishing and functional testing of a canine corneal construct. **Veterinary Ophthalmology.** v.11,n. 5, p.280-289, 2008.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; MCLAUGHLIN, P.J. Re-epithelization of the rat cornea is accelerated by blockade of opioid receptors. **Brain Research.** v.798, p. 254-260, 1998.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grau de dor observado nas úlceras de córneas não contaminadas varia de ausência de dor a dor moderada. Em úlceras contaminadas pode haver uma escala de dor maior, devido a presença da infecção e maior destruição celular.

Desta forma, pesquisas no campo da analgesia são mandatórios para contribuir no avanço do tratamento das ceratites ulcerativa, em especial com drogas que promovam analgesia sem atrasar a cicatrização corneana.

A administração de solução de sulfato de morfina 1% mostrou-se eficiente para o controle da dor, mesmo causando uma leve irritação ocular logo após sua instilação, com tempo de cicatrização inferior ao grupo tratado com diclofenaco.

Novos estudos são necessários para se produzir uma solução de morfina para administração ocular, com excipiente não irritante à superfície ocular.