

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

INVESTIGAÇÕES FISIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS SOBRE A INTERAÇÃO  
ENTRE O ÓRGÃO DA VISÃO E O APARELHO CARDIOVASCULAR EM COELHOS  
E CÃES

CURITIBA

2014

AMÁLIA TURNER GIANNICO

INVESTIGAÇÕES FISIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS SOBRE A INTERAÇÃO  
ENTRE O ÓRGÃO DA VISÃO E O APARELHO CARDIOVASCULAR EM COELHOS  
E CÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação da Universidade Federal do Paraná para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA

2014

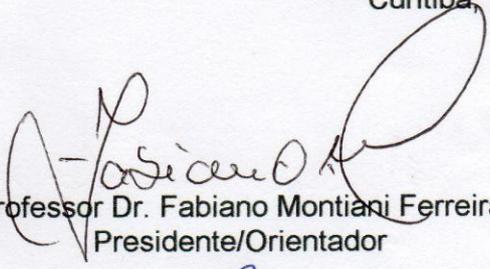
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

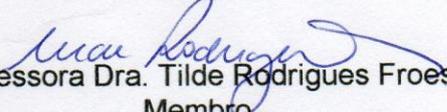


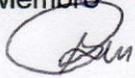
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“INVESTIGAÇÕES FISIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE O ÓRGÃO DA VISÃO E O APARELHO CARDIOVASCULAR EM COELHOS E CÃES”** apresentada pela Mestranda **AMÁLIA TURNER GIANNICO** 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, 19 de fevereiro de 2014

  
Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira  
Presidente/Orientador

  
Professora Dra. Tilde Rodrigues Froes  
Membro

  
Dra. Heloisa Helena Abil Russ  
Membro

## **Agradecimentos**

A meu orientador Prof. Fabiano Montiani-Ferreira pelo apoio, confiança, paciência nestes anos de convívio. Obrigada pelo tempo; dedicação e importantes ensinamentos despendidos nesta orientação!

À Dra. Heloísa Russ e Profa. Tilde Rodrigues Froes por participarem da banca examinadora e pela amizade.

A todos os amigos e colegas pela amizade, estímulo, críticas e sugestões. Além disso, por contribuírem durante as atividades como um unido grupo de pesquisa.

Também gostaria de agradecer à médica veterinária Gillian Shaw que sempre com muita boa vontade nos ajudou nas correções dos artigos.

Também deixo expressos meus sinceros agradecimentos aos professores e funcionários da Universidade Federal do Paraná que contribuíram de alguma forma neste mestrado.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus pais e irmã pelo amor e incentivo. Também ao Leandro presente em todos os momentos importantes da vida.

## RESUMO

A presente pesquisa buscou contribuir com informações sobre as interações do órgão da visão com o aparelho cardiovascular, particularmente no que tange os efeitos colaterais das drogas empregadas no tratamento do glaucoma. Adicionalmente, procurou-se caracterizar o reflexo oculocardíaco em coelhos e cães, por se tratar de um fenômeno fisiológico notabilizado, mas ainda pouco detalhado na literatura. Para tanto, o trabalho foi subdividido em quatro capítulos independentes. No primeiro capítulo o enfoque da pesquisa foi investigar os efeitos dos análogos da prostaglandina no fluxo sanguíneo da artéria oftálmica em coelhos por meio da realização de ultrassonografia com Doppler. Este trabalho demonstrou a diminuição do índice de resistência com a utilização de alguns análogos da prostaglandina de forma tópica que, indiretamente, melhoram o fluxo sanguíneo na artéria oftálmica e potencialmente poderiam ser mais bem explorados nos protocolos terapêuticos específicos para a prevenção da neuropatia óptica que acompanha o glaucoma. O segundo capítulo discorre sobre a avaliação ultrassonográfica com Doppler em coelhos, investigando os efeitos do maleato de timolol e combinações de maleato de timolol com  $\alpha$ -agonistas e inibidores da anidrase carbônica no fluxo sanguíneo na artéria oftálmica. Estas drogas também podem resultar em alterações importantes no fluxo sanguíneo, dependendo de suas propriedades específicas e seus efeitos sinérgicos com cada combinação oftálmica. O terceiro capítulo refere-se à caracterização da ocorrência do reflexo oculocardíaco em coelhos e cães conscientes, observando o efeito do estímulo de compressão ocular sobre a frequência cardíaca. Além de comentar sobre a fisiologia deste reflexo, este estudo demonstra a importância do conhecimento dessa resposta fisiológica para anestesiologistas e oftalmologistas veterinários durante cirurgias oftálmicas ou manipulações oculares. O quarto capítulo, diferente dos três anteriores, não está diretamente associado com o aparelho cardiovascular. Todavia, este capítulo investiga efeitos colaterais dos análogos da prostaglandina, classe de drogas que como já citado anteriormente pode afetar o aparelho cardiovascular, mas desta vez caracterizando as ações destas drogas sobre os cílios. Desta forma, este estudo visou relatar e melhor investigar o efeito no comprimento dos cílios decorrente ao tratamento tópico de quatro diferentes colírios de análogos da prostaglandina em coelhos. Atualmente apenas a formulação tópica de bimatoprost 0,03% é aprovada para o uso como estimulante do crescimento dos cílios em seres humanos, mas esta pesquisa mostrou que a tafluprost poderia ser mais bem explorada pela indústria cosmética e farmacêutica. Trata-se de achado interessante, inédito e de grande importância para a oftalmologia comparada e medicina estética.

**Palavras-chaves:** Doppler colorido, ultrassonografia Doppler, hemodinâmica orbital, glaucoma, análogos da prostaglandina,  $\beta$ -bloqueadores, compressão ocular, frequência cardíaca, hipertríose, *Oryctolagus cuniculus*, cão

## ABSTRACT

This research aimed to contribute to the understanding of the interactions between the organ of vision and the cardiovascular system, particularly regarding the side effects of drugs used in the glaucoma treatment. Additionally, we aimed to characterize the oculocardiac reflex in rabbits and dogs. This reflex is a well-known physiological phenomenon that, however, has not been fully detailed in literature yet. In order to achieve these objectives, the study was divided into four sections. In the first section, the focus was on investigating the effects of prostaglandin analogues on the blood flow of the ophthalmic artery in rabbits using Doppler ultrasonography. This study demonstrated changes of resistive index with the use of selected prostaglandin analogues that indirectly may improve blood flow in the ophthalmic artery and potentially could be further explored in the treatment of glaucoma, specifically for the prevention of optic neuropathy. The second section discusses the Doppler ultrasonography evaluation on the effects of topical timolol maleate and fixed combinations of timolol maleate with  $\alpha$ -agonists and carbonic anhydrase inhibitors on the blood flow of the ophthalmic artery in rabbits. These latter drugs can also result in significant changes in blood flow, depending on their specific properties and their synergistic effects with each ophthalmic combination. The third section investigates the characterization of the occurrence of oculocardiac reflex in conscious rabbits and dogs. It was possible to observe with this experiment the effect of ocular compression on heart rate. Besides commenting on the physiology of the oculocardiac reflex, this investigation demonstrates the importance of knowledge of this physiological response to veterinary ophthalmologists and anesthetists during ophthalmic surgery or ocular manipulations. However, the fourth section, unlike the previous three ones, is not directly associated with the cardiovascular system. Nevertheless, this section investigated side effects of prostaglandin analogues, a class of drugs which, as previously mentioned, can affect the cardiovascular system, but on this time the actions of these drugs on the eyelashes was scrutinized. Thus, the study aimed to investigate the effect on eyelash length of four different topical eyedrops of prostaglandin analogues in rabbits. Currently, only topical bimatoprost 0.03% formulation is approved for use as eyelash growth stimulant in human beings, but this research showed that tafluprost could be further explored by the cosmetic and pharmaceutical industry as well. It is an interesting and novel finding of great importance for the comparative ophthalmology and esthetic medicine.

**Keywords:** color Doppler, Doppler ultrasonography, orbital hemodynamics, glaucoma, prostaglandin analogs,  $\beta$ -blockers, ocular compression, heart rate, hypertrichosis, *Oryctolagus cuniculus*, dog

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1 – A) Imagem de um coelho da raça Nova Zelândia durante o exame ultrassonográfico. O transdutor foi colocado no plano horizontal, com eixo do comprimento paralelo a linha que liga o canto medial e lateral, com o marcador apontando nasalmente. B) Imagem retrobulbar da ultrassonografia com Doppler. O fluxo sanguíneo em direção ao transdutor foi codificado em vermelho pelo modo *power* Doppler. A artéria oftálmica foi detectada e o volume de amostragem de 1 mm do Doppler espectral foi colocado no centro e paralelamente ao vaso (seta). Abaixo é possível visualizar a onda do fluxo sanguíneo e suas velocidades. Note formato dicrótico de onda do pulso da artéria oftálmica. PVS, pico da velocidade sistólica; VDF, velocidade diastólica final .....15
- Figura 2.1 – A) Imagem de um coelho da raça Nova Zelândia durante o exame ultrassonográfico. O transdutor foi colocado no plano horizontal, com eixo do comprimento paralelo a linha que liga o canto medial e lateral, com o marcador apontando nasalmente. B) Imagem retrobulbar da ultrassonografia com Doppler demonstrando onda do fluxo sanguíneo e suas velocidades. Note formato dicrótico de onda do pulso da artéria oftálmica. PVS, pico da velocidade sistólica; VDF, velocidade diastólica final .....27
- Figura 3.1 – Diferentes etapas da investigação do reflexo oculocardíaco demonstrado em um coelho da raça Nova Zelândia. Observe os eletrodos fixados diretamente sobre a pele para gravar o eletrocardiograma. A) Intervalo de um minuto entre cada compressão; apenas com delicada contenção física (Etapas 1, 3, 5 e 7). B) Compressão ocular por meio de pressão digital contínua com o polegar sobre a pálpebra direita (Etapa 2). C) Compressão ocular do olho esquerdo (Etapa 4). D) Compressão ocular de ambos os olhos simultaneamente (Etapa 6) .38
- Figura 3.2 – Diferentes etapas da investigação do reflexo oculocardíaco demonstrado em um cão da raça Beagle. A) Intervalo de um minuto entre cada compressão; apenas com delicada contenção física (Etapas 1, 3, 5 e 7). B) Compressão ocular por meio de pressão digital contínua com o polegar sobre a pálpebra direita (Etapa 2). C) Compressão ocular do olho esquerdo (Etapa 4). D) Compressão ocular de ambos os olhos simultaneamente (Etapa 6) .....39
- Figura 3.3 – Eletrocardiograma de um coelho da raça Nova Zelândia (derivação II, 50 mm/s, 20 mm/mV). A) Etapa 1, com ausência de compressão digital dos olhos, frequência cardíaca de 258 bpm. B) Etapa 6, com compressão digital de ambos os olhos simultaneamente, frequência cardíaca de 222 bpm.....42
- Figura 3.4 – Eletrocardiograma de uma cadela da raça Beagle (derivação II, 50 mm/s, 10 mm/mV). A) Etapa 1, com ausência de compressão digital dos olhos, frequência cardíaca de 126 bpm. B) Etapa 6, com compressão digital de ambos os olhos simultaneamente, frequência cardíaca de 96 bpm.....42
- Figura 4.1 – Procedimento de medição de cílios sendo demonstrado no olho esquerdo de um coelho da raça Nova Zelândia. A) Cinco cílios mais longos foram selecionados a partir da região central da pálpebra superior (6 mm de comprimento - seta preta). B) Mensuração de um cílio na região central da pálpebra superior, com um paquímetro digital de aço inoxidável .....52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Colírios de análogos da prostaglandina e apenas o conservante cloreto de benzalcônio (BAK) utilizados em coelhos da raça Nova Zelândia, seus nomes comerciais, fabricante e número de fêmeas e machos .....	14
Tabela 1.2 – Resultados dos valores do pico da velocidade sistólica (PVD), velocidade diastólica final (VDF), em centímetro por segundo, e índice de resistência (IR) no pré e pós-tratamento com colírios análogos da prostaglandina e apenas o conservante cloreto de benzalcônio (BAK) na artéria oftálmica de coelhos da raça Nova Zelândia .....	16
Tabela 2.1 – Grupos de coelhos da raça Nova Zelândia que utilizaram formulações oftálmicas de maleato de timolol, maleato de timolol associado em combinações fixas e veículo com cloreto de benzalcônio (BAK), seus nomes comerciais, fabricante e número de fêmeas e machos de cada grupo .....	25
Tabela 2.2 – Resultados dos valores (média $\pm$ desvio padrão) do pico da velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF) em centímetros por segundo, e índice de resistência (IR) no pré e pós-tratamento com colírios de timolol, timolol com combinações fixas e apenas veículo com cloreto de benzalcônio (BAK), mensuradas por meio da ultrassonografia com Doppler da artéria oftálmica de coelhos da raça Nova Zelândia .....	28
Tabela 3.1 – Diferentes estágios em ordem cronológica da compressão ocular e pausas realizadas em coelhos da raça Nova Zelândia e cães da raça Beagle durante a investigação .....	39
Tabela 3.2 – Média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), valor máximo e mínimo da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto durante as etapas com e sem compressão ocular em 34 coelhos da raça Nova Zelândia .....	41
Tabela 3.3 – Média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), valor máximo e mínimo da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto durante as etapas com e sem compressão ocular em 15 cães da raça Beagle .....	41
Tabela 4.1 – Média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP) e coeficiente de variação (CV) dos valores dos comprimentos dos cílios na região central da palpebral superior expressos em milímetros, com valor de <i>P</i> das comparações entre pré e pós-tratamento com análogos da prostaglandina (OS) e olho não tratado (OD) em coelhos da raça Nova Zelândia.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	artéria oftálmica
APG	análogo da prostaglandina
APGs	análogos da prostaglandina
BAK	cloreto de benzalcônio
BAK-free	droga livre de conservante
bmp	batimentos por minuto
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CV	coeficiente de variação
DP	desvio padrão
ECG	exame eletrocardiográfico
EP	erro padrão
FC	frequência cardíaca
IACs	inibidores da anidrase carbônica
IR	índice de resistência
mm	milímetros
mV	milivolts
OD	oculus dexter
OS	oculum sinister
OU	oculus uterque
PIO	pressão intraocular
PVS	pico da velocidade sistólica
ROC	reflexo oculocardíaco
s	segundos
UD	ultrassonografia com Doppler
VDF	velocidade diastólica final

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: Efeitos dos análogos da prostaglandina na velocidade do fluxo sanguíneo e resistência na artéria oftálmica do coelho</b> .....	11
Resumo .....	11
Abstract .....	11
1.1 Introdução.....	12
1.2 Material e métodos .....	13
1.3 Resultados.....	16
1.4 Discussão e conclusão .....	17
1.5 Referências .....	19
<b>CAPÍTULO 2: Efeitos das formulações tópicas de timolol e das combinações fixas de timolol sobre a velocidade do fluxo sanguíneo e resistência na artéria oftálmica de coelhos</b> .....	22
Resumo .....	22
Abstract .....	22
2.1 Introdução.....	23
2.2 Material e métodos .....	25
2.3 Resultados .....	28
2.4 Discussão e conclusão .....	29
2.5 Referências .....	32
<b>CAPÍTULO 3: Caracterização do reflexo oculocardiaco durante a compressão do bulbo ocular em coelhos e cães da raça Beagle</b> .....	35
Resumo .....	35
Abstract .....	35
3.1 Introdução.....	36
3.2 Material e métodos.....	37
3.3 Resultados.....	41
3.4 Discussão e conclusão .....	44
3.5 Referências .....	47
<b>CAPÍTULO 4: Crescimento dos cílios induzido pelo uso tópico de análogos da prostaglandina: bimatoprost, tafluprost, travoprost e latanoprost em coelhos</b> .....	49
Resumo .....	49
Abstract .....	49
4.1 Introdução.....	50
4.2 Material e métodos .....	51
4.3 Resultados.....	53
4.4 Discussão e conclusão .....	54
4.5 Referências .....	57

<b>ANEXOS E APÊNDICES .....</b>	<b>59</b>
5.1 Aprovação no Comitê de Ética do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná .....	59
5.2 Artigo científico publicado na revista <i>Veterinary Ophthalmology: Characterization of the oculocardiac reflex during compression of the globe in Beagle dogs and rabbits</i> .....	61
5.3 Artigo científico publicado na revista <i>Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: Eyelash growth induced by topical prostaglandin analogues, bimatoprost, tafluprost, travoprost, and latanoprost in rabbits</i> .....	62
5.4 Artigo científico publicado na Revista do CRMV: Leucismo em Sabiá-Laranjeira ...	63
5.5 Artigo científico publicado na revista PUBMED: Parâmetros eletrocardiográficos de tigras-d'água norte-americanas ( <i>Trachemys scripta elegans</i> ) em duas temperaturas corporais” .....	64
5.6 Artigo científico publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira: Valores eletrocardiográficos em saguis-de-tufo-preto ( <i>Callithrix penicillata</i> ) .....	65
5.7 VITA .....	66

## CAPÍTULO 1

### Efeitos dos análogos da prostaglandina na velocidade do fluxo sanguíneo e resistência na artéria oftálmica do coelho

#### Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos dos análogos da prostaglandina (APGs) no fluxo sanguíneo da artéria oftálmica em coelhos. Cinquenta e cinco coelhos da raça Nova Zelândia clinicamente saudáveis foram divididos em seis grupos para tratamento com formulação tópica de diferentes APGs (bimatoprost, tafluprost, travoprost e latanoprost) e formulações contendo apenas o conservante cloreto de benzalcônio (BAK). Foi realizada ultrassonografia com Doppler antes e após os tratamentos. Os valores do pico da velocidade sistólica (PVS) e da velocidade diastólica final (VDF) foram obtidos e o índice de resistência (IR) foi então calculado. Estes colírios APGs não afetaram o PVS. A bimatoprost com o conservante BAK, travoprost com o conservante poliquaternário-1 (POLYQUAD) e latanoprost com o conservante BAK não alteraram o IR. Já o tratamento com tafluprost sem conservante (BAK-free) e travoprost com o conservante BAK promoveram redução similar dos valores do IR. Não houve diferença significativa na comparação entre valores pré e pós-tratamento quando BAK foi administrado isoladamente. Por reduzirem o IR, a tafluprost BAK-free e travoprost BAK indiretamente melhoram o fluxo sanguíneo na artéria oftálmica e potencialmente poderiam ser mais bem exploradas nos protocolos terapêuticos específicos para a prevenção da neuropatia óptica que acompanha o glaucoma.

**Palavras-chave:** Doppler colorido, hemodinâmica orbital, glaucoma, *Oryctolagus cuniculus*

#### Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of prostaglandin analogs on blood flow in the ophthalmic artery in clinically healthy rabbits. Fifty-five clinically healthy New Zealand white rabbits were divided into six groups and the left eyes were treated for four weeks with a topical formulation of four different prostaglandin analogues (bimatoprost, tafluprost, travoprost and latanoprost) or only the preservative benzalkonium chloride (BAK). Color Doppler imaging was performed before and after the treatments. Values of peak systolic velocity (PSV) and end diastolic velocity (EDV) were averaged and resistive index (RI) was calculated. Prostaglandin analogs did not affect PSV. Bimatoprost BAK, travoprost polyquaternium-1 (POLYQUAD) and latanoprost BAK did not change RI. Tafluprost BAK-free and travoprost BAK therapy promoted a similar decrease of RI values. No significant differences pre- and post-treatment were found when BAK was administered alone. Indirectly, travoprost BAK-free and tafluprost BAK improved blood flow secondary to RI reduction in the ophthalmic artery. Therefore, these drugs could potentially be better explored in specific therapeutic protocols for prevention of the optic neuropathy that accompany glaucoma cases.

**Keywords:** color Doppler imaging, orbital hemodynamics, glaucoma, *Oryctolagus cuniculus*

## 1.1 Introdução

O glaucoma é uma doença multifatorial caracterizada por uma neuropatia óptica progressiva com perda do campo visual. Historicamente, a pressão intraocular (PIO) elevada foi considerada como a principal causa de lesão do nervo óptico no glaucoma, mas ultimamente há evidências de que outros fatores estão envolvidos na sua patogênese, tais como alterações no fluxo sanguíneo, perfusão e aporte de oxigênio (Drance et al., 2001). Há evidências convincentes que apoiam a teoria de que a diminuição do fluxo sanguíneo ocular contribui para a neuropatia óptica glaucomatosa (Carter et al., 1990; Gasser; Flammer, 1991; Harris et al., 1994; Rankin et al., 1994; Duijm et al., 1997; Drance et al., 2001). Em um modelo experimental de lesão do nervo óptico, foi demonstrado que alterações de perfusão e distribuição de oxigênio nas células ganglionares da retina podem contribuir de forma importante para a perda da visão (Cioffi et al., 2004; Cioffi, 2005). Portanto, são necessárias maiores avaliações da hemodinâmica da circulação orbital, a fim de entender melhor esse distúrbio.

A hemodinâmica dos vasos sanguíneos orbitais pode ser quantificada pela ultrassonografia com Doppler (UD), que permite estimar a velocidade do fluxo sanguíneo e a resistência vascular. Este método tem sido amplamente utilizado para estudar os parâmetros de fluxo nos vasos sanguíneos retrobulbares de seres humanos e animais (Galassi et al., 1994; Williamson; Harris, 1996; Kaiser et al., 1997; Gelatt-Nicholson et al., 1999; Rankin, 1999; Liu et al., 2007; Yang et al., 2011). Pesquisas com UD mostraram que o fluxo sanguíneo retrobulbar está reduzido nos pacientes com glaucoma. Tal fato pode ser demonstrado pelo aumento do índice de resistência (IR) frequentemente encontrado nesses pacientes. Um elevado valor do IR está correlacionado com aumento da resistência vascular, o que conduz a uma diminuição da perfusão que, por sua vez, contribui para a neuropatia óptica glaucomatosa (Hayreh et al., 1970; Pourcelot, 1974; Pozniak et al., 1988; Carter et al., 1990; Williamson; Harris, 1996; Liu et al., 2007). Portanto, o aumento do IR nos pacientes com glaucoma pode ter um valor preditivo para a progressão da doença (Martinez; Sanchez, 2005; Zeitz et al., 2006).

Os análogos da prostaglandina (APGs) são drogas comumente prescritas para reduzir a PIO em pacientes com glaucoma. Eles atuam principalmente aumentando a reabsorção do humor aquoso pela via uveoscleral, no entanto

também parecem facilitar a reabsorção convencional pela malha trabecular no ângulo iridotrabeculocorneano (Schachtschabel et al., 2000).

Considerando a crescente evidência de que existe uma patogênese vascular para o glaucoma, uma diminuição do fluxo sanguíneo poderia acelerar o desenvolvimento desta doença. Assim, além da capacidade em reduzir a PIO, os efeitos dos APGs podem ser potencialmente prejudiciais ou benéficos para a hemodinâmica ocular.

A maioria das formulações oftálmicas para tratamentos tópicos do glaucoma contém conservantes que inibem o crescimento bacteriano, sendo o mais comum deles o cloreto de benzalcônio (BAK), um sal de amônio quaternário. Em pesquisas com seres humanos demonstrou-se que a exposição crônica ao BAK é associada com sintomas de desconforto ocular, atribuídos à instabilidade do filme lacrimal, densidade reduzida das células epiteliais superficiais, quebra da barreira lacrimal e inflamação da conjuntiva, induzidos por este conservante (Pisella et al., 2002; Ishibashi et al., 2003; Martone et al., 2009). Estes efeitos indesejáveis podem ser reduzidos ou até mesmo reversíveis nos pacientes com glaucoma por meio da substituição de drogas com BAK por drogas com outros conservantes, como o poliquaternário-1 (POLYQUAD) ou por drogas livres de conservante, denominadas BAK-free (Pisella et al., 2002; Katz et al., 2010). Sabe-se atualmente que o BAK é absorvido e se acumula em estruturas oculares envolvidas na patogênese do glaucoma, mas os efeitos potenciais dos conservantes na vasculatura e na hemodinâmica do olho não são conhecidos (Champeau; Edelhauser, 1986; Brignole-Baudouin et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos das soluções tópicas de APGs com e sem conservantes sobre o fluxo sanguíneo da artéria oftálmica (AO) em coelhos clinicamente saudáveis.

## **1.2 Material e métodos**

A pesquisa foi realizada com 55 coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) saudáveis, de seis meses de idade, sendo 32 fêmeas e 23 machos com peso entre 2,2 e 3,0 kg. Os animais foram selecionados aleatoriamente de um criador comercial. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as

normas para uso de animais em pesquisa do Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná. Alimento e água foram fornecidos a vontade.

Exames físicos e oftálmicos foram realizados e os coelhos com evidências de doenças oftálmicas ou sistêmicas foram excluídos da pesquisa. Para evitar discrepâncias inter-investigadores, o mesmo investigador realizou a UD. Outro investigador instilou o colírio em toda a pesquisa.

Os coelhos foram divididos em seis grupos e seus olhos esquerdos foram tratados durante quatro semanas com uma gota uma vez ao dia de colírio de análogo da prostaglandina (APG). As drogas oftálmicas e o número de machos e fêmeas estão listados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Colírios de análogos da prostaglandina com o conservante cloreto de benzalcônio (BAK), sem conservante (BAK-free) e com o conservante poliquaternário-1 (POLYQUAD) e apenas o conservante BAK utilizados em coelhos da raça Nova Zelândia, seus nomes comerciais, fabricantes e número de fêmeas e machos

Tratamentos	Nome comercial	Fabricante	Animais	
			Fêmeas	Machos
Bimatoprost 0,03% <sup>BAK 0,005%</sup>	Lumigan	Allergan Indústria Farmacêutica Ltda. Guarulhos, SP	5	5
Tafloprost 0,0015% <sup>BAK-free</sup>	Saflutan	Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP	6	4
Travoprost 0,004% <sup>BAK 0,015%</sup>	Travatan*	Alcon Laboratórios do Brasil Ltda. São Paulo, SP	5	5
Travoprost 0,004% <sup>POLYQUAD 0,001%</sup>	Travatan*	Alcon Laboratórios do Brasil Ltda. São Paulo, SP	7	3
Latanoprost 0,005% <sup>BAK 0,02%</sup>	Xalatan	Pfizer Indústria Farmacêutica São Paulo, SP	6	4
BAK 0,01%	-	"Ophthalmos" Farmácia de manipulação oftálmica São Paulo, SP	3	2

\*Não há diferença no nome comercial entre os colírios Travatan<sup>BAK</sup> e Travatan<sup>POLYQUAD</sup>

A UD foi realizada antes e após o tratamento com os colírios, utilizando aparelho de ultrassonografia (MyLab 30 - Esaote, Genova, Itália), equipado com transdutor linear de 12 MHz. Os animais não foram anestesiados e as imagens ultrassonográficas dos olhos e órbitas foram adquiridas com o animal em decúbito esternal. O exame de UD foi realizado em todos os animais pelos mesmos dois investigadores, um deles realizou a contenção do coelho, enquanto o outro realizava o exame propriamente dito. Uma pequena quantidade de gel de transmissão ultrassônica (Sonic-Plus, Hal Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP) foi aplicada sobre os olhos para a realização da UD após a instilação de uma gota de anestesia tópica (colírio oftálmico de tetracaína). O transdutor foi cuidadosamente posicionado em plano horizontal, com o mínimo de pressão, com seu eixo longo na horizontal,

entre os cantos lateral e medial, com o marcador apontando nasalmente (Figura 1.1A).

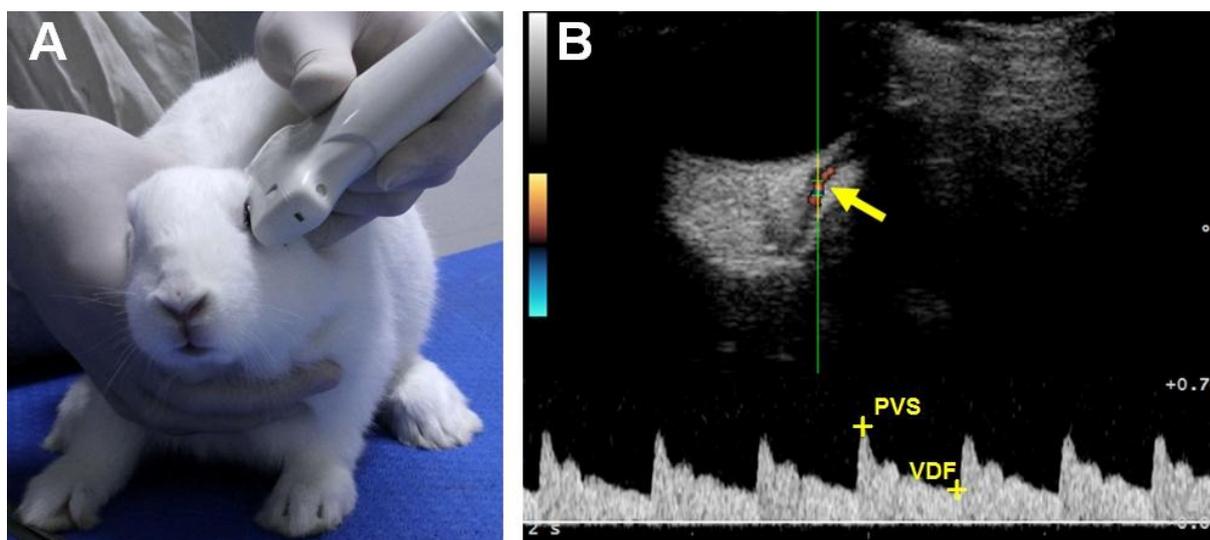


Figura 1.1 – A) Imagem de um coelho da raça Nova Zelândia durante o exame ultrassonográfico. O transdutor foi colocado no plano horizontal, com eixo do comprimento paralelo a linha que liga o canto medial e lateral, com o marcador apontando nasalmente. B) Imagem retrobulbar da ultrassonografia com Doppler. O fluxo sanguíneo em direção ao transdutor foi codificado em vermelho pelo modo *power* Doppler. A artéria oftálmica foi detectada e o volume de amostragem de 1 mm do Doppler espectral foi colocado no centro e paralelamente ao vaso (seta). Abaixo é possível visualizar a onda do fluxo sanguíneo e suas velocidades. Note formato dicrótico de onda do pulso da artéria oftálmica. PVS, pico da velocidade sistólica; VDF, velocidade diastólica final

Utilizou-se o cone da periórbita na região retrobulbar juntamente com o *power* Doppler para determinar a AO. Após a detecção do fluxo sanguíneo pelo *power* Doppler, o volume de amostragem do Doppler espectral foi colocado no centro da artéria. A AO é facilmente identificável pela sua característica de onda na forma dicrótica, que está associada com o fechamento da valva aórtica (Williamson; Harris, 1996; Rankin, 1999). O feixe de ultrassom e AO foram paralelos, e o volume da amostra foi ajustado para 1 mm (Figura 1.1B). Os valores do pico da velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF) de três ondas do Doppler espectral foram aferidos e sua média estimada (Figura 1.1B). O IR do fluxo sanguíneo desta artéria foi calculado utilizando a fórmula  $[(PVS - VDF) / PVS]$ .

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado para demonstrar que os erros dos dados eram normalmente distribuídos. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do *software StatView* (SAS Institute, Cary, NC, EUA), aplicando o teste-*t* pareado para comparar possíveis diferenças entre resultados do pré e pós-tratamento para cada droga; e ANOVA 2-way e Tukey-Kramer como pós

teste para comparar potenciais diferenças entre os dados finais das drogas no pós-tratamento. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

### 1.3 Resultados

Média e desvio padrão dos valores do PVS, VDF e IR no pré e pós-tratamento estão apresentados na Tabela 1.2. O PVS e a VDF estão expressos em centímetros por segundo (cm/s), enquanto que IR, como um índice, não apresenta unidade.

Tabela 1.2 – Resultados dos valores do pico da velocidade sistólica (PVS), velocidade diastólica final (VDF), em centímetro por segundo, e índice de resistência (IR) no pré e pós-tratamento com colírios análogos da prostaglandina com o conservante cloreto de benzalcônio (BAK), sem conservante (BAK-free) e com o conservante poliquaternário-1 (POLYQUAD) e apenas o conservante BAK na artéria oftálmica de coelhos da raça Nova Zelândia

Tratamentos	PVS		VDF		IR	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Bimatoprost <sup>BAK 0,005%</sup>	31,19 ± 4,88	34,89 ± 7,17	8,21 ± 2,89	9,94 ± 3,38	0,74 ± 0,08	0,74 ± 0,10
Tafluprost <sup>BAK-free</sup>	36,64 ± 5,50	30,03 ± 8,92	9,80 ± 2,81	11,22 ± 4,71	0,73 ± 0,07	0,63 ± 0,07*
Travoprost <sup>BAK 0,015%</sup>	29,21 ± 5,79	31,91 ± 11,14	8,49 ± 3,45	13,62 ± 6,55	0,71 ± 0,09	0,59 ± 0,07*
Travoprost <sup>POLYQUAD 0,001%</sup>	34,81 ± 9,34	33,01 ± 10,44	9,68 ± 3,46	10,48 ± 5,29	0,72 ± 0,05	0,68 ± 0,09
Latanoprost <sup>BAK 0,02%</sup>	34,57 ± 6,23	30,07 ± 8,57	10,94 ± 3,51	9,20 ± 4,73	0,69 ± 0,06	0,70 ± 0,06
Controle <sup>BAK 0,01%</sup>	33,88 ± 7,37	34,26 ± 11,95	8,10 ± 1,67	9,10 ± 2,84	0,75 ± 0,07	0,73 ± 0,04

Nota: Os valores estão expressos como média ± desvio padrão  
\* $P < 0,05$ ; teste-*t* pareado entre os resultados pré e pós-tratamento

A comparação dos valores do PVS, VDF e IR no pré-tratamento do olho esquerdo de todos os animais não foi significativamente diferente ( $P > 0,05$ ), demonstrando que esses parâmetros foram provavelmente homogêneos entre os grupos antes do tratamento.

Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos no pré e no pós-tratamento para os parâmetros PVS e VDF em todos os animais, ou entre pré e pós-tratamento para valores de IR nos coelhos que receberam bimatoprost BAK, travoprost POLYQUAD ou latanoprost BAK ( $P > 0,05$ ).

No entanto, os olhos que receberam tafluprost BAK-free e travoprost BAK tiveram uma diminuição significativa do IR após o tratamento ( $P = 0,003$  e  $P = 0,005$ , respectivamente). Esta diminuição do IR foi semelhante para ambas às drogas, já que a comparação entre os valores pós-tratamento nos olhos que receberam tafluprost BAK-free e travoprost BAK não foi significativa ( $P = 0,6$ ).

## 1.4 Discussão e conclusão

Em geral, as prostaglandinas desempenham um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo local, e ambas as prostaglandinas endógenas, bem como APGs podem causar efeitos vasodilatadores potentes (Horton, 1969; Kimura et al., 1992). Pesquisas anteriores, tanto em seres humanos como em modelos animais, relataram que os APGs podem afetar o fluxo sanguíneo ocular. Dependendo da droga ou formulação utilizadas, os APGs já demonstraram poder causar aumento, diminuição ou ainda não afetar o fluxo sanguíneo ocular. No entanto, há relatos conflitantes estudando o mesmo princípio com resultados opostos em alguns casos (Ishii et al., 2001; Ishikawa et al., 2002; Ohashi et al., 2007; Dong et al., 2008; Akaishi et al., 2010).

Nesta pesquisa, tafluprosta BAK-*free* significativamente reduziu o IR na AO em coelhos. Esta diminuição no IR pode ser interpretada como um efeito benéfico sobre o fluxo sanguíneo ocular. Nos primatas, a isquemia crônica do nervo óptico parece induzir a perda de células ganglionares da retina, independentemente da PIO aumentada (Cioffi et al., 2004; Cioffi, 2005). Conseqüentemente, esta redução do IR na AO pode também, possivelmente, ser importante para o tratamento do glaucoma, mais precisamente na prevenção da morte de células ganglionares da retina. Além da diminuição do IR, outros fatores devem ser considerados na escolha de qual desses APGs prescrever, como uma mais efetiva diminuição da PIO e, neste caso específico, a ausência do conservante. A presença de conservantes em formulações tópicas de drogas antiglaucomatosas está sendo um tópico investigativo muito valorizado atualmente (Stalmans et al., 2013). A exposição crônica ao conservante BAK tem sido associada com desconforto ocular, causando alterações no filme lacrimal, córnea (incluindo o epitélio corneano) e conjuntiva (Pisella et al., 2002; Ishibashi et al., 2003; Martone et al., 2009).

Nenhum efeito sobre os parâmetros de UD foi encontrado com o uso de bimatoprosta BAK, travoprosta POLYQUAD ou latanoprosta BAK, enquanto o tratamento com tafluprosta BAK-*free* e travoprosta BAK diminuiu significativamente o IR. Curiosamente, a travoprosta formulada com dois conservantes diferentes mostrou resultados discrepantes. A formulação de travoprosta com o conservante BAK teve o IR significativamente menor no pós-tratamento, enquanto este fato não

foi observado nos coelhos tratados com a formulação de travoprostá com o conservante POLYQUAD. Assim, o conservante BAK neste caso específico parece promover aumento do fluxo sanguíneo na AO. Pouco se conhece sobre os efeitos em longo prazo de diferentes conservantes em relação à sua penetração e distribuição ocular, mas reconhece-se que o BAK é absorvido e acumula-se nas estruturas da superfície ocular, bem como nas estruturas mais profundas, envolvidas no glaucoma (Champeau; Edelhauser, 1986; Brignole-Baudouin et al., 2012). Além disso, deve-se levar em consideração a quantidade deste conservante no momento da análise dos resultados, já que as formulações oftálmicas têm concentrações diferentes de BAK. Todavia, não se exclui o fato de que tal diferença significativa possa também ter ocorrido ao acaso, ou seja, de tratar-se de um erro estatístico do tipo I. Caso não tenhamos caído neste erro, os resultados desta pesquisa sugerem que a combinação desse APG com BAK diminui o IR, melhorando o fluxo sanguíneo ocular. Apesar desta alteração no IR observada no grupo com travoprostá BAK, reduções significativas do IR não foram encontradas nos animais que receberam as outras drogas também com o conservante BAK ou que receberam apenas BAK. É possível que o BAK especificamente aumente o IR de forma sinérgica com o princípio ativo travoprostá por um mecanismo ainda desconhecido. No entanto, algumas investigações evidenciaram que colírios formulados com conservantes diferentes de BAK ou sem conservantes têm demonstrado pouca ou nenhuma toxicidade ocular e por este motivo deveriam ter maior preferência (Liang et al., 2008; Ammar et al., 2010; Ammar; Kahook, 2011; Whitson; Petroll, 2012; Rouland et al., 2013).

Este estudo revela o efeito de diferentes APGs utilizados para o tratamento do glaucoma no fluxo sanguíneo na AO em coelhos da raça Nova Zelândia saudáveis. Outros estudos com seres humanos e pacientes com glaucoma (seres humanos e animais) são necessários para estabelecer os efeitos de cada tratamento e se a melhora do fluxo sanguíneo retrobulbar pode prevenir a progressão da doença.

## 1.5 Referências

Akaishi, T., Kurashima, H., Odani-Kawabata, N., et al. Effects of repeated administrations of tafluprost, latanoprost, and travoprost on optic nerve head blood flow in conscious normal rabbits. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 26:181–186, 2010.

Ammar, D.A., and Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride- or polyquad-preserved fixed combination glaucoma medications on human trabecular meshwork cells. *Mol. Vis.* 17:1806–1813, 2011.

Ammar, D.A., Noecker, R.J., and Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Adv. Ther.* 27:837–845, 2010.

Brignole-Baudouin, F., Desbenoit, N., Hamm, G., et al. A new safety concern for glaucoma treatment demonstrated by mass spectrometry imaging of benzalkonium chloride distribution in the eye, an experimental study in rabbits. *PLoS ONE* 7:e50180, 2012.

Carter, C.J., Brooks, D.E., Doyle, D.L. et al. Investigations into a vascular etiology for low-tension glaucoma. *Ophthalmology* 97:49–55, 1990.

Champeau, E.J., and Edelhauser, H.F. The effect of ophthalmic preservatives on the ocular surface: conjunctival and corneal uptake and distribution of Benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate. In: Holly, F.J., editor. *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear*. Lubbock, TX: Dry eye Institute, Inc.; 1986.

Cioffi, G.A. Ischemic model of optic nerve injury. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 103:592–613, 2005.

Cioffi, G.A., Wang, L., Fortune, B. et al. Chronic ischemia induces regional axonal damage in experimental primate optic neuropathy. *Arch. Ophthalmol.* 122:1517–1525, 2004.

Dong, Y., Watabe, H., Su, G., et al. Relaxing effect and mechanism of tafluprost on isolated rabbit ciliary arteries. *Exp. Eye Res.* 87:251–256, 2008.

Drance, S., Anderson, D.R., and Schulzer, M. Risk factors for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 131:699–708, 2001.

Duijm, H.F., Van Den Berg, T.J., and Greve, E.L. A comparison of retinal and choroidal hemodynamics in patients with primary open angle glaucoma and normal-pressure glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 123:644–656, 1997.

Galassi, F., Nuzzaci, G., Sodi, A. et al. Possible correlations of ocular blood flow parameters with intraocular pressure and visual-field alterations in glaucoma: a study by means of color Doppler imaging. *Ophthalmologica* 208:304–308, 1994.

Gasser, P., and Flammer, J. Blood-cell velocity in the nailfold capillaries of patients with normal-tension and high-tension glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 111:585–588, 1991.

Gelatt-Nicholson, K.J., Gelatt, K.N., MacKay, E. et al. Doppler imaging of the ophthalmic vasculature of the normal dog: blood velocity measurements and reproducibility. *Vet. Ophthalmol.* 2:87–96, 1999.

Harris, A., Sergott, R.C., Spaeth, G.L. et al. Color doppler analysis of ocular vessel blood velocity in normal-tension glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 118:642–649, 1994.

- Hayreh, S.S., Revie, I.H.S., and Edwards, J. Vasogenic origin of visual field defects and optic nerve change in glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 54:461–472, 1970.
- Horton, E.W. Hypotheses on physiological roles of prostaglandins. *Physiol. Rev.* 49:122–161, 1969.
- Ishibashi, T., Yokoi, N., and Kinoshita, S. Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. *J. Glaucoma* 12:486–490, 2003.
- Ishii, K., Tomidokoro, A., Nagahara, M. et al. Effects of topical latanoprost on optic nerve head circulation in rabbits, monkeys, and humans. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:2957–2963, 2001.
- Ishikawa, H., Yoshitomi, T., Mashimo, K., et al. Pharmacological effects of latanoprost, prostaglandin E2, and F2alpha on isolated rabbit ciliary artery. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 240:120–125, 2002.
- Kaiser, H.J., Schoetzau, A., Stümpfig, D., et al. Blood flow velocities of the extraocular vessels in patients with high-tension and normal-tension primary openangle glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 123:320–327, 1997.
- Katz, G., Springs, C.L., Craven, E.R., et al. Ocular surface disease in patients with glaucoma or ocular hypertension treated with either BAK-preserved latanoprost or BAK-free travoprost. *Clin. Ophthalmol.* 4:1253–1261, 2010.
- Kimura, T., Yoshida, Y., and Toda, N. Mechanisms of relaxation induced by prostaglandins in isolated canine uterine arteries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 67:1409–1416, 1992.
- Liang, H., Baudouin, C., Pauly, A., et al. 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, 2008.
- Liu, J.H., Li, R., Nelson, T.R. et al. Resistance to blood flow in the rabbit ophthalmic artery after topical treatment with timolol. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 23:103–109, 2007.
- Martinez, A., and Sanchez, M. Predictive value of colour Doppler imaging in a prospective study of visual field progression in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol. Scand.* 83:716–722, 2005.
- Martone, G., Frezzotti, P., Tosi, G.M., et al. 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, 2009.
- Ohashi, M., Mayama, C., Ishii, K., et al. Effects of topical travoprost and unoprostone on optic nerve head circulation in normal rabbits. *Curr. Eye Res.* 32:743–749, 2007.
- Pisella, P.J., Pouliquen, P., and Baudouin, C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br. J. Ophthalmol.* 86:418–423, 2002.
- Pourcelot, L. *Velocimetrie ultrasonore Doppler*. Siminaire INSERM. Paris, France: Editions INSERV 213–240, 1974.
- Pozniak, M.A., Kelez, F., and Stratta, R.J. Extraneous factors affecting resistive index. *Invest. Radiol.* 23:899–904, 1988.

Rankin, S.J. Color Doppler imaging of the retrobulbar circulation in glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 43:176–182, 1999.

Rankin, S.J., Walman, B.E., Bukley, A.R. et al. Color Doppler imaging and analysis of the optic nerve vasculature in glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 119:685–693, 1994.

Rouland, J.F., Traverso, C.E., Stalmans, I. et al. Efficacy and safety of preservative-free latanoprost eyedrops, compared with BAK-preserved latanoprost in patients with ocular hypertension or glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 97:196–200, 2013.

Schachtschabel, U., Lindsey, J.D., and Weinreb, R.N. The mechanism of action of prostaglandins on uveoscleral outflow. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 11:112–115, 2000.

Stalmans, I., Sunaric Mégevand, G., Cordeiro, M.F., et al. Preservative-free treatment in glaucoma: who, when, and why. *Eur. J. Ophthalmol.* 23:518–525, 2013.

Whitson, J.T., and Petroll, W.M. Corneal epithelial cell viability following exposure to ophthalmic solutions containing preservatives and/or antihypertensive agents. *Adv. Ther.* 29:874–888, 2012.

Williamson, T.H., and Harris, A. Color Doppler ultrasound imaging of the eye and orbit. *Surv. Ophthalmol.* 40:255–267, 1996.

Yang, Q., Shen, J., Guo, W. et al. Effect of acute intraocular pressure elevation on blood flow velocity and resistance in the rabbit ophthalmic artery. *Vet. Ophthalmol.* 14:353–357, 2011.

Zeitz, O., Galambos, P., Wagenfeld, L., et al. Glaucoma progression is associated with decreased blood flow velocities in the short posterior ciliary artery. *Br. J. Ophthalmol.* 90:1245–1248, 2006.

## CAPÍTULO 2

### Efeitos das formulações tópicas de timolol e das combinações fixas de timolol sobre a velocidade do fluxo sanguíneo e resistência na artéria oftálmica de coelhos

#### Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do maleato de timolol e das combinações de maleato de timolol com  $\alpha$ -agonistas e inibidores da anidrase carbônica no fluxo sanguíneo na artéria oftálmica (AO) em coelhos clinicamente saudáveis. Cinquenta e cinco coelhos da raça Nova Zelândia foram divididos em seis grupos e seus olhos esquerdos foram tratados durante quatro semanas com uma formulação tópica de timolol e timolol com diferentes combinações (brimonidina, brinzolamida e dorzolamida) ou apenas o conservante cloreto de benzalcônio (BAK). A ultrassonografia com Doppler foi realizada antes e após os tratamentos. Os valores do pico de velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF) foram avaliados e o índice de resistência (IR) foi calculado. O timolol BAK causou diminuição significativa no PVS e VDF, resultando em aumento significativo do IR, mas as mudanças significativas no PVS não foram observadas nas outras combinações fixas de timolol. Vários efeitos foram encontrados quando as combinações fixas de timolol com drogas antiglaucomasas foram usadas. O timolol associado com brimonidina BAK aumentou de forma significativa a VDF e diminuiu significativamente o IR. As associações de timolol com dorzolamida BAK e BAK-free tiveram os valores da VDF significativamente menores e conseqüentemente significativos aumentos do IR, no pós-tratamento. A combinação de timolol com brinzolamida BAK diminuiu significativamente o IR. Não foram encontradas diferenças significativas no controle com BAK durante o pré e pós-tratamento. Tanto o timolol como o timolol em combinações fixas pode resultar em alterações importantes no fluxo sanguíneo na AO em coelhos saudáveis. Essas alterações dependem das propriedades específicas de cada droga e seus efeitos sinérgicos de cada combinação oftálmica.

**Palavras-chave:** ultrassonografia Doppler, fluxo vascular,  $\beta$ -bloqueadores, *Oryctolagus cuniculus*

#### Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of topical timolol alone and timolol and fixed combinations with  $\alpha$ -agonists and carbonic anhydrase inhibitors on blood flow in the ophthalmic artery in clinically healthy rabbits. Fifty-five clinically healthy New Zealand white rabbits were divided into six groups and the left eyes were treated for four weeks with a topical formulation of a timolol and timolol in various combinations (brimonidine, brinzolamide and dorzolamide) or only the preservative benzalkonium chloride (BAK). Color Doppler imaging was performed before and after the treatments. Values of peak systolic velocity (PSV) and end diastolic velocity (EDV) were averaged and resistive index (RI) was calculated. Timolol BAK caused a decrease in PSV and EDV, resulting in an increase RI, but changes in PSV were not observed in the other timolol fixed combinations. Timolol associated with brimonidine BAK increased EDV and decreased RI, associated with dorzolamide BAK and BAK-free decreased EDV and increased RI, with brinzolamide BAK decreased RI. No significant differences were found in control solutions BAK during pre and post-treatment. Timolol and timolol with fixed combinations drugs may result in great changes in blood flow in the ophthalmic artery in healthy New Zealand white rabbits. These changes are dependent of specific drug properties and its synergistic effects on each ophthalmic association.

**Key words:** blood flow, color Doppler imaging, ophthalmic artery,  $\beta$ -blocker, *Oryctolagus cuniculus*

## 2.1 Introdução

Glaucoma é um termo que descreve um grupo de doenças oftálmicas com etiologia multifatorial, unidos pela característica clínica de elevada pressão intraocular (PIO) associada à neuropatia óptica com perda de campo visual. As alterações de perfusão e fornecimento de oxigênio para as células ganglionares da retina estão envolvidas na patogênese do glaucoma e podem contribuir para a perda da visão (Drance et al., 2001). Desta maneira, a diminuição do fluxo sanguíneo ocular pode desempenhar papel importante na patogênese da neuropatia óptica glaucomatosa (Carter et al., 1990; Gasser; Flammer, 1991; Harris et al., 1994; Rankin et al., 1994; Duijm et al., 1997).

A ultrassonografia com Doppler (UD) é um exame capaz de quantificar a hemodinâmica dos vasos sanguíneos orbitais. Essa modalidade ultrassonográfica permite estimar velocidades e resistência do fluxo sanguíneo nos animais conscientes. Nos seres humanos com glaucoma o fluxo sanguíneo retrobulbar é reduzido, observado pelo elevado índice de resistência (IR) durante o exame de UD, e pode ter valor preditivo para a progressão da doença (Martinez; Sanchez, 2005; Zeitz et al., 2006). Em resumo, elevados valores de IR expressam aumento da resistência vascular, o que acarreta na diminuição da perfusão, que por sua vez, pode contribuir para a neuropatia óptica glaucomatosa (Hayreh et al., 1970; Pourcelot, 1974; Pozniak et al., 1988; Carter et al., 1990; Williamson; Harris, 1996; Liu et al., 1997). Desta maneira, há grande interesse nos efeitos vasomotores das drogas oftálmicas.

Os antagonistas dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -bloqueadores) como o timolol, os análogos da prostaglandina (APGs), os inibidores da anidrase carbônica (IACs) como a brinzolamida e a dorzolamida, e os  $\alpha$ -agonistas seletivos como a brimonidina são classes de agentes redutores da PIO comumente prescritos para seres humanos e animais com glaucoma. Ambos os  $\beta$ -bloqueadores e IACs reduzem a PIO agindo no humor aquoso, sendo que os  $\beta$ -bloqueadores reduzem sua produção e os IACs diminuem sua secreção (Zimmerman, 1993; Supuran et al., 2003). Os  $\alpha$ -agonistas seletivos primariamente reduzem a PIO por meio da diminuição da produção do humor aquoso, além de causarem aumento da drenagem uveoscleral como efeito secundário (Toris et al., 1995).

Nas formulações oftálmicas, é comum a prescrição associada a mais de uma classe de drogas hipotensoras, devido aos diferentes mecanismos de ação e efeitos sinérgicos para redução da PIO. Sabe-se que o uso de formulações tópicas oftálmicas com dois agentes hipotensores em uma única formulação é benéfico, pois simplifica o protocolo de tratamento e diminui a exposição diária aos conservantes presentes nos colírios (Ammar; Kahook, 2011). O maleato de timolol é frequentemente utilizado associado a outras drogas em combinações comerciais, como com associações entre  $\beta$ -bloqueadores, IACs, APGs ou  $\alpha$ -agonista seletivos (Fechtner; Realini, 2004).

O cloreto de benzalcônio (BAK), sal de amônio quaternário, é o conservante mais comumente utilizado nas formulações oftálmicas em geral, incluindo as drogas antiglaucomatosas. A exposição crônica ao BAK nos tratamentos tópicos prolongados como o do glaucoma esteve associada ao desenvolvimento de uma série de alterações oculares em pessoas, como desconforto ocular por causar instabilidade do filme lacrimal, sensação de “olho seco”, densidade reduzida das células epiteliais superficiais, alterações da função de barreira do epitélio da córnea, e inflamação da conjuntiva (Pisella et al., 2002; Ishibashi et al., 2003; Martone et al., 2009). Esses efeitos indesejados, relacionados à presença do conservante, podem ser reversíveis, como visto em pacientes que substituíram o tratamento com as drogas convencionais que utilizavam o BAK como conservante para o uso de colírios livres de conservante, também denominados de *BAK-free* (Pisella et al., 2002; Katz et al., 2010). A absorção do BAK pela conjuntiva pode se acumular nas estruturas oculares durante longos tratamentos, todavia os efeitos deste conservante sobre o fluxo vascular ocular ainda permanecem desconhecidos (Champeau; Edelhauser, 1986; Brignole-Baudouin et al., 2012).

Considerando as crescentes evidências que sustentam a patogênese vascular para o glaucoma, a diminuição do fluxo sanguíneo poderia acelerar o desenvolvimento da doença. Por conseguinte, além das suas capacidades de redução da PIO, os efeitos destas drogas podem ser potencialmente prejudiciais ou benéficos para a hemodinâmica ocular. O objetivo deste estudo foi examinar os efeitos das formulações oftálmicas de maleato de timolol e das combinações comerciais de maleato de timolol sobre o fluxo sanguíneo da artéria oftálmica (AO) em coelhos clinicamente saudáveis.

## 2.2 Material e métodos

A pesquisa foi realizada com 55 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia clinicamente saudáveis, de seis meses de idade, pesando entre 2,1 e 2,9 kg. Foram empregados 23 machos e 32 fêmeas. Os animais foram selecionados aleatoriamente de um criador comercial do Paraná. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas para o uso de animais em experimentação, aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná.

Durante o tratamento experimental, os animais receberam alimento e água fornecidos livremente. As variações do ambiente permaneceram relativamente estáveis entre 70% de umidade e 22,5°C. Animais que demonstraram evidências de doença sistêmica ou oftálmica foram excluídos antes do início da pesquisa após avaliação clínica e oftálmica. Para evitar discrepâncias inter-investigadores, um único investigador realizou todos os procedimentos de ultrassonografia com Doppler (UD) e os colírios foram instilados por outro investigador.

Os coelhos foram divididos em seis grupos distintos de acordo com cada tratamento. Apenas o olho esquerdo de cada animal foi tratado durante quatro semanas ininterruptas, com aplicação de uma gota de colírio, a cada 12 horas. As drogas oftálmicas utilizadas em seus respectivos grupos estão listadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Grupos de coelhos da raça Nova Zelândia que utilizaram formulações oftálmicas de maleato de timolol, maleato de timolol associado em combinações fixas e veículo com cloreto de benzalcônio (BAK), seus nomes comerciais, fabricante e número de fêmeas e machos de cada grupo

Tratamentos	Nome comercial	Fabricante	Animais	
			Fêmeas	Machos
Maleato de timolol 0,5% <sup>BAK 0,01%</sup>	Timoptol	MSD – Merck Sharp & Dohme Ltda. Guarulhos, SP	6	4
Brimonidina 1% associada ao maleato de timolol 0,5% <sup>BAK 0,005%</sup>	Combigan	Allergan Indústria Farmacêutica Ltda. Guarulhos, SP	6	4
Brinzolamida 1% associada ao maleato de timolol 0,5% <sup>BAK 0,01%</sup>	Azorga	Alcon Laboratórios do Brasil Ltda. São Paulo, SP	5	5
Dorzolamida 2% associada ao maleato de timolol 0,5% <sup>BAK-free</sup>	Cosopt <i>Preservative Free</i>	MSD - Merck Sharp & Dohme France Paris, France	6	4
Dorzolamida 2% associada ao maleato de timolol 0,5% <sup>BAK 0,0075%</sup>	Cosopt	MSD - Merck Sharp & Dohme Ltda. Guarulhos, SP	5	5
BAK 0,01%	–	“Ophthalmos” Farmácia de manipulação oftálmica São Paulo, SP	4	1

A UD foi realizada antes e após o tratamento, utilizando aparelho de ultrassonografia (MyLab 30 – Esaote, Genova, Itália) equipado com transdutor linear de 12 MHz. Os coelhos não foram anestesiados e os olhos e região orbital tiveram UD realizada com o animal em decúbito esternal. Todos os exames de UD foram realizados pelas mesmas duas pessoas, uma realizava a contenção do coelho, enquanto a outra realizava o exame. Anteriormente à avaliação ultrassonográfica, foi instilada uma gota de colírio oftálmico de tetracaína para efeito anestésico tópico dos olhos, sendo consecutivamente aplicado gel de transmissão ultrassônica (Sonic-Plus, Hal Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP) para realização do exame. O transdutor foi cuidadosamente posicionado perpendicularmente ao olho, sobre o gel, tomando-se o cuidado para realizar a avaliação exercendo o mínimo de pressão suficiente para detecção da imagem. O eixo longo do transdutor foi colocado horizontalmente entre o canto lateral e medial com o marcador apontando para o canto nasal (medialmente) (Figura 2.1A).

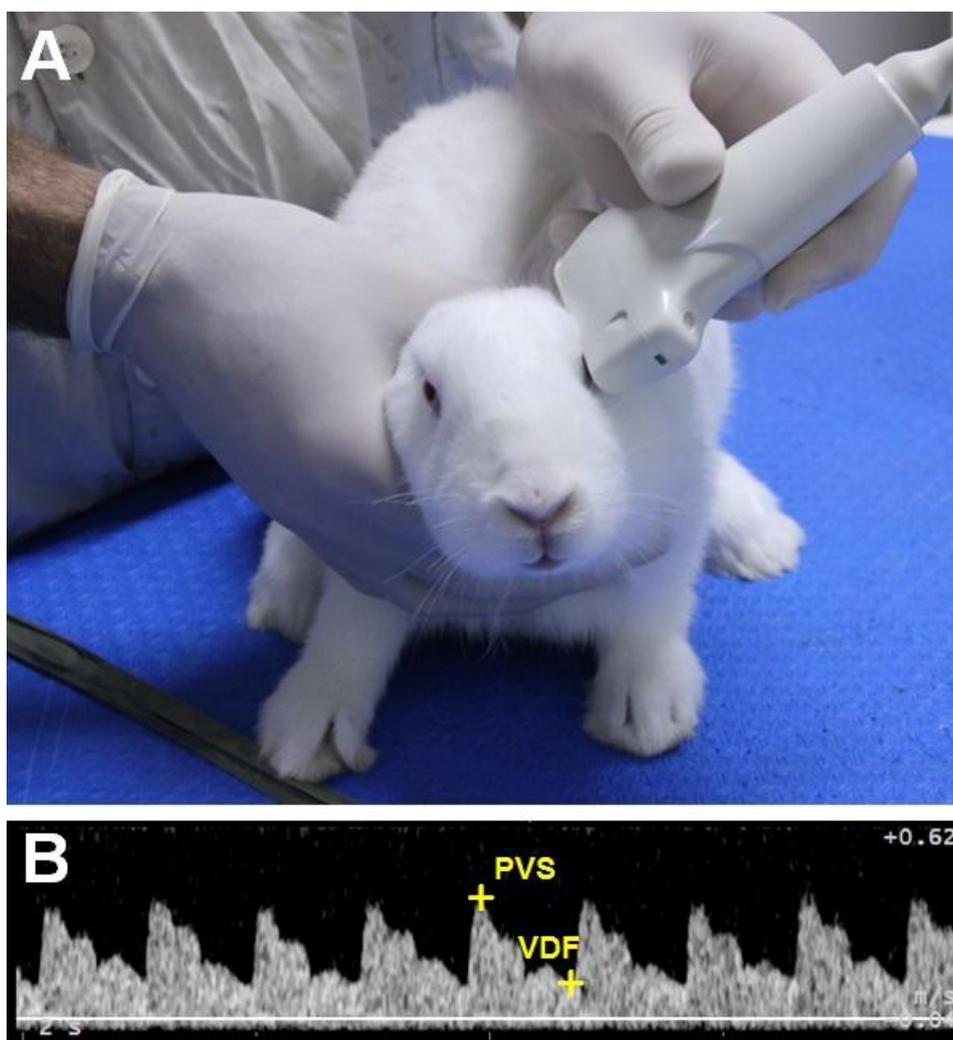


Figura 2.1 – A) Imagem de um coelho da raça Nova Zelândia durante o exame ultrassonográfico. O transdutor foi colocado no plano horizontal, com eixo do comprimento paralelo a linha que liga o canto medial e lateral, com o marcador apontando nasalmente. B) Imagem retrobulbar da ultrassonografia com Doppler demonstrando onda do fluxo sanguíneo e suas velocidades. Note formato dicrótico de onda do pulso da artéria oftálmica. PVS, pico da velocidade sistólica; VDF, velocidade diastólica final

A AO foi detectada posteriormente ao bulbo ocular, localizando-se o cone da periórbita na região retrobulbar e utilizando o modo *power* Doppler. Após a detecção do fluxo sanguíneo pelo *power* Doppler, o volume de amostragem do Doppler espectral foi colocado no centro do vaso. A AO foi facilmente identificável pela sua característica de onda dicrótica, que está associada ao fechamento da valva aórtica (Figura 1B) (Williamson; Harris, 1996; Rankin et al., 1999). O feixe de ultrassom foi ajustado paralelamente à AO e o volume da amostragem foi ajustado em 1 mm. Os valores do pico de velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF) de três pulsos foram mensurados e a média adquirida (Figura 1B). O índice de

resistência (IR) do fluxo sanguíneo foi calculado utilizando a fórmula  $[(PVS - VDF) / PVS]$ .

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para demonstrar que os erros de dados eram normalmente distribuídos. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do *software StatView* (SAS Institute, Cary, NC, EUA), aplicando-se o teste-*t* pareado para comparar possíveis diferenças entre os resultados pré e pós-tratamento para cada droga. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 2.3 Resultados

A média e desvio padrão dos valores no pré e pós-tratamento para os parâmetros PVS, VDF e IR estão apresentados na Tabela 2.2. Pico da velocidade sistólica e VDF estão expressos em centímetros por segundo (cm/s).

Tabela 2.2 – Resultados dos valores (média  $\pm$  desvio padrão) do pico da velocidade sistólica (PVS) e velocidade diastólica final (VDF) em centímetros por segundo, e índice de resistência (IR) no pré e pós-tratamento com colírios de timolol, timolol com combinações fixas e apenas veículo com cloreto de benzalcônio (BAK), mensuradas por meio da ultrassonografia com Doppler da artéria oftálmica de coelhos da raça Nova Zelândia

Tratamentos	PVS		VDF		IR	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Timolol <sup>BAK 0,01%</sup>	34,79 $\pm$ 8,54	26,18 $\pm$ 4,46*	11,94 $\pm$ 5,25	6,91 $\pm$ 2,08*	0,67 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,05*
Brimonidina/timolol <sup>BAK 0,005%</sup>	35,31 $\pm$ 5,83	39,46 $\pm$ 6,55	7,86 $\pm$ 2,10	11,97 $\pm$ 4,78*	0,78 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,09*
Brinzolamida/timolol <sup>BAK 0,01%</sup>	36,31 $\pm$ 8,34	33,05 $\pm$ 12,80	7,69 $\pm$ 2,89	10,29 $\pm$ 4,50	0,79 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,10*
Dorzolamida/timolol <sup>BAK-free</sup>	38,31 $\pm$ 9,81	30,66 $\pm$ 6,18	14,03 $\pm$ 6,81	7,19 $\pm$ 3,60*	0,65 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,10*
Dorzolamida/timolol <sup>BAK 0,0075%</sup>	42,56 $\pm$ 8,45	34,31 $\pm$ 9,51	17,12 $\pm$ 5,76	10,69 $\pm$ 6,03*	0,61 $\pm$ 0,08	0,70 $\pm$ 0,12*
BAK 0,01%	37,68 $\pm$ 8,48	30,56 $\pm$ 8,57	10,04 $\pm$ 4,60	8,38 $\pm$ 2,36	0,73 $\pm$ 0,12	0,71 $\pm$ 0,10

\* $P < 0,05$ , teste-*t* pareado entre os resultados pré e pós-tratamento

Comparando os parâmetros no pré e pós-tratamento nos animais que receberam maleato de timolol 0,5% BAK, os valores do PVS e VDF tiveram diminuição significativa ( $P=0,01$  e  $P=0,01$ , respectivamente) e os valores do IR tiveram aumento significativo ( $P=0,03$ ).

A avaliação dos valores pré e pós-tratamento do PVS para os demais grupos que utilizaram maleato de timolol associado às combinações fixas não evidenciaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). Coelhos que receberam timolol com brimonidina tiveram aumento significativo no valor da VDF ( $P=0,02$ ). Os animais que receberam timolol com combinações de dorzolamida BAK e BAK-free também apresentaram diminuição significativa nos valores da VDF ( $P=0,02$  e  $P=0,03$ , respectivamente).

Nos animais que receberam timolol em combinação com a brimonidina ou brinzolamida, foi encontrada diminuição significativa nos valores do IR, comparando valores do pré com pós-tratamento ( $P=0,03$  e  $P=0,01$ , respectivamente). No entanto, os coelhos que receberam timolol em combinação com dorzolamida BAK e BAK-free apresentaram aumento significativo no IR ( $P=0,01$  e  $P=0,04$ , respectivamente) comparando os valores pré e pós-tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas comparando pré com pós-tratamento entre PVS, VDF ou valores de IR nos animais que receberam apenas o conservante BAK ( $P>0,05$ ).

## 2.4 Discussão e conclusão

Neste estudo, os animais que receberam o maleato de timolol isoladamente ou em combinação com a dorzolamida apresentaram aumento significativo do IR. Esta mudança provavelmente ocorreu por vasoconstrição direta da AO causado por este  $\beta$ -bloqueador. A vasoconstrição ocular tem a capacidade de aumentar a resistência do fluxo sanguíneo (Van Buskirk; Bacon, 1990). O efeito do maleato de timolol sobre o fluxo sanguíneo ocular tem sido o foco de uma variedade de pesquisas com seres humanos e coelhos. Alguns estudos relataram que não ocorreram alterações no fluxo ocular após o tratamento com timolol a curto ou longo prazo (Lubeck et al., 2001; Fuchsjager-Mayrl et al., 2005), ao passo que outras investigações, incluindo esta, demonstraram aumento na resistência ocular causada pelo maleato de timolol (Nicollela et al., 1996; Liu et al., 2007). Esta diminuição no fluxo sanguíneo observada pelo aumento do IR leva à diminuição da perfusão sanguínea e pode, por sua vez, contribuir para a neuropatia óptica glaucomatosa (Hayreh et al., 1970; Pourcelot, 1974; Pozniak et al., 1988; Carter et al., 1990; Williamson; Harris, 1996; Liu et al., 1997). Trata-se de um achado com potencial de impacto direto na escolha das associações de timolol quando o objetivo é evitar a neuropatia óptica do glaucoma. Tanto as formulações de timolol isolado como a combinação fixa de timolol com dorzolamida são comumente prescritos para pacientes (seres humanos e animais) com glaucoma. Se os resultados aqui obtidos fossem levados em consideração, estas duas apresentações seriam contraindicadas por aumentarem o IR e potencialmente contribuir, pelo menos em tese, para o desenvolvimento da neuropatia óptica.

Já a brimonidina, um  $\alpha$ -agonista seletivo, demonstrou que, mesmo em combinação com maleato de timolol, diminuiu significativamente o IR. Esta droga pode ter produzido vasodilatação via receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos das células endoteliais, liberando fatores relaxantes (Murray; Leopold, 1985; Bockman et al., 1993; Greenfield et al., 1997; Angus et al., 1998). Algumas investigações mostraram que a brimonidina administrada isoladamente reduziu o IR na AO de seres humanos com glaucoma (Silva et al., 2001). No entanto, dois outros estudos também com seres humanos com glaucoma, demonstram que nenhuma alteração foi observada no fluxo sanguíneo ocular utilizando a brimonidina com timolol (Hommer et al., 2012; Siesky et al., 2012). Além da diminuição do IR demonstrada por esta pesquisa, novos trabalhos vêm sugerindo a capacidade de neuroproteção desta medicação, evidenciando outras razões para a utilização da brimonidina (Lee et al., 2012; Pfeiffer et al., 2013; Grove et al., 2014). Semelhante à brimonidina, a brinzolamida (um IAC) em combinação com o maleato de timolol, diminuiu significativamente o IR, presumivelmente aumentando o fluxo sanguíneo. O bloqueio da anidrase carbônica em tecidos locais pode aumentar as concentrações teciduais de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e reduzir o pH do tecido, resultando em dilatação vascular e aumento do fluxo sanguíneo (Rassam et al., 1993; Taki et al., 1999). Paradoxalmente observou-se, como citado acima, que outro membro desta classe de drogas, a dorzolamida, aumentou significativamente o IR quando administrada em combinação com maleato de timolol (BAK e BAK-free), embora em teoria, a dorzolamida devesse diminuir o IR, secundariamente à ação de dilatação vascular dos IACs. Uma possível explicação seria que presença do maleato de timolol, droga esta causadora do aumento do IR quando administrada isoladamente, e não da dorzolamida é que verdadeiramente elevou o IR. Uma forma de se confirmar ou não a interferência do timolol na ação desta combinação fixa seria a realização de um grupo no qual somente a dorzolamida seria empregada e comparar os resultados. No entanto, tal grupo não foi realizado.

Os potenciais efeitos deletérios dos conservantes em formulações tópicas antiglaucomatosas se tornaram foco de várias investigações (Stalmans et al., 2013). A exposição crônica ao conservante BAK tem sido associada com desconforto ocular, causando alterações no filme lacrimal, córnea e conjuntiva (Pisella et al., 2002; Ishibashi et al., 2003; Martone et al., 2009). Assim, colírios sem conservantes estão se tornando uma tendência. A ação deletéria de conservantes tópicos no fluxo

sanguíneo dos vasos retrobulbares nunca foi investigada anteriormente. Os resultados desta pesquisa demonstraram que a terapia tópica com BAK não produziu diferença no fluxo sanguíneo ao comparar os valores do pré e pós-tratamento, durante o período de estudo. Além disso, os grupos de animais tratados com associação de maleato de timolol e dorzolamida (BAK e BAK-free) apresentaram alterações semelhantes no fluxo sanguíneo da AO. Estes fatos indicam que BAK como conservante não afeta o fluxo sanguíneo, nas condições do estudo. Acredita-se que o efeito do BAK sobre o fluxo vascular em uma situação de uso contínuo e mais prolongado não seja suficiente para resultar em alteração do fluxo importante, porém esta resposta só poderá ser respondida em um estudo futuro. Além disso, deve-se analisar e comparar as diferentes concentrações de BAK de cada formulação oftálmica.

Esta pesquisa demonstrou os efeitos do maleato de timolol a 0,5% isolado e em combinação com diferentes drogas antiglaucomatosas sobre o fluxo sanguíneo na AO em coelhos saudáveis. Aparentemente, o maleato de timolol utilizado na forma isolada reduz o fluxo sanguíneo na AO, apesar de sua inquestionável ação na redução da PIO (Zimmerman, 1993). Também ocorre redução do fluxo sanguíneo na AO quando o timolol é combinado com a dorzolamida. No entanto, quando o timolol é combinado com a brimonidina ou com a brinzolamida, esta alteração no fluxo sanguíneo parece ser compensada pela ação vasodilatadora de ambas as drogas. Ao escolher um protocolo de combinação fixa de drogas, para promover redução da PIO sem prejudicar o fluxo sanguíneo na AO, deve-se ponderar o uso das combinações que contenham maleato de timolol. Outros estudos de uso mais prolongado com seres humanos saudáveis e pacientes com glaucoma (seres humanos e animais) são ainda necessários para estabelecer as alterações de cada tratamento e se a melhoria do fluxo sanguíneo retrobulbar terá qualquer influência na progressão desta doença. Adicionalmente, há ainda a necessidade particular de se realizar no futuro as comparações entre a ação da dorzolamida isolada com as ações do timolol isolado sobre o fluxo da AO em novos grupos experimentais.

## 2.5 Referências

Ammar, D.A., and Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride- or polyquad-preserved fixed combination glaucoma medications on human trabecular meshwork cells. *Mol. Vis.* 17: 1806–1813, 2011.

Angus, J.A., Cocks, T.M., Wright, C.E. et al. Endothelium - dependent responses in large arteries and in the microcirculation. In: Vanhoutte PM, editor *Relaxing and contracting factors: biological and clinical research*. Totowa NJ: Humana Press, p. 361–387, 1998.

Bockman, C.S., Jeffries, W.B., and Abel, P.W. Binding and functional characterizations of  $\alpha$ -2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 1126–1133, 1993.

Brignole-Baudouin, F., Desbenoit, N., Hamm, G. et al. A new safety concern for glaucoma treatment demonstrated by mass spectrometry imaging of benzalkonium chloride distribution in the eye, an experimental study in rabbits. *PLoS ONE* 7: e50180, 2012.

Carter, C.J., Brooks, D.E., Doyle, D.L., et al. Investigations into a vascular etiology for low-tension glaucoma. *Ophthalmology* 97: 49–55, 1990.

Champeau, E.J., and Edelhauser, H.F. The effect of ophthalmic preservatives on the ocular surface: conjunctival and corneal uptake and distribution of Benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate. In: Holly FJ, editor. *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear*. Lubbock, TX: Dry eye Institute, Inc.; 1986.

Drance, S., Anderson, D.R., and Schulzer, M. Risk factors for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 131: 699–708, 2001.

Duijm, H.F., Van Den Berg, T.J., and Greve, E.L. A comparison of retinal and choroidal hemodynamics in patients with primary open angle glaucoma and normal-pressure glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 123: 644–656, 1997.

Fechtner, R.D., and Realini, T. Fixed combinations of topical glaucoma medications. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 15: 132–135, 2004.

Fuchsjager-Mayrl, G., Wally, B., Rainer, G., et al. Effect of dorzolamide and timolol on ocular blood flow in patients with primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *Br. J. Ophthalmol.* 89: 1293–1297, 2005.

Gasser, P., and Flammer, J. Blood-cell velocity in the nailfold capillaries of patients with normal-tension and high-tension glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 111: 585–588, 1991.

Greenfield, D.S., Liebmann, J.M., and Ritch, R. Brimonidine: A new  $\alpha$ 2-adrenoreceptor agonist for glaucoma treatment. *J. Glaucoma* 6:250–257, 1997.

Grove, K., Dobish, J., Harth, E., et al. Trans-meningeal drug delivery to optic nerve ganglion cell axons using a nanoparticle drug delivery system. *Exp. Eye Res.* 118:42–45, 2014.

Harris, A., Sergott, R.C., Spaeth, G.L., et al. Color doppler analysis of ocular vessel blood velocity in normal-tension glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 118: 642–649, 1994.

Hayreh, S.S., Revie, I.H.S., and Edwards, J. Vasogenic origin of visual field defects and optic nerve change in glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 54: 461–472, 1970.

Hommer, A., Sperl, P., Resch, H., et al. A double-masked randomized crossover study comparing the effect of latanoprost/timolol and brimonidine/timolol fixed combination on intraocular pressure and ocular blood flow in patients with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 28: 569–575, 2012.

Ishibashi, T., Yokoi, N., and Kinoshita, S. Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. *J. Glaucoma* 12: 486–490, 2003.

Katz, G., Springs, C.L., Craven, E.R., et al. Ocular surface disease in patients with glaucoma or ocular hypertension treated with either BAK-preserved latanoprost or BAK-free travoprost. *Clin. Ophthalmol.* 4: 1253–1261, 2010.

Lee, D., Kim, K.Y., Noh, Y.H., et al. Brimonidine blocks glutamate excitotoxicity-induced oxidative stress and preserves mitochondrial transcription factor a in ischemic retinal injury. *PLoS One.* 7:e47098. 2012.

Liu, C.J., Chou, Y.H., and Chou, J.C. Retrobulbar hemodynamic changes studied by color Doppler imaging in glaucoma. *Eye* 11: 818–826, 1997.

Liu, J.H., Li, R., Nelson, T.R., et al. Resistance to blood flow in the rabbit ophthalmic artery after topical treatment with timolol. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 23:103–109, 2007.

Lubeck, P., Orgul, S., Gugleta, K., et al. Effect of timolol on anterior optic nerve blood flow in patients with primary open-angle glaucoma as assessed by the Heidelberg retina flowmeter. *J. Glaucoma* 10: 13–17, 2001.

Martinez, A., and Sanchez, M. Predictive value of colour Doppler imaging in a prospective study of visual field progression in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol. Scand.* 83: 716–722, 2005.

Martone, G., Frezzotti, P., Tosi, G.M., et al. 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, 2009.

Murray, D.L., and Leopold, I.H. Alpha-adrenergic receptors in rabbit eyes. *J. Ocul. Pharmacol.* 1: 3–18, 1985.

Nicolela, M.T., Buckley, A.R., Walman, B.E., et al. A comparative study of the effects of timolol and latanoprost on blood flow velocity of the retrobulbar vessels. *Am. J. Ophthalmol.* 122: 784–789, 1996.

Nordstrom, B.L., Friedman, D.S., Mozaffari, E., et al. Persistence and adherence with topical glaucoma therapy. *Am. J. Ophthalmol.* 140: 598–606, 2005.

Pfeiffer, N., Lamparter, J., Gericke, A., et al. Neuroprotection of medical IOP-lowering therapy. *Cell. Tissue Res.* 353:245–251, 2013.

Pisella, P.J., Pouliquen, P., and Baudouin, C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br. J. Ophthalmol.* 86: 418–423, 2002.

Pourcelot, L. Velocimetrie ultrasonore Doppler. Siminaire INSERM. Paris, France: Editions INSERV 213–240, 1974.

- Pozniak, M.A., Kelez, F., and Stratta, R.J. Extraneous factors affecting resistive index. *Invest. Radiol.* 23: 899–904, 1988.
- Rankin, S.J. Color Doppler imaging of the retrobulbar circulation in glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 43: 176–182, 1999.
- Rankin, S.J., Walman, B.E., Bukley, A.R., et al. Color Doppler imaging and analysis of the optic nerve vasculature in glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 119: 685–693, 1994.
- Rassam, S.M., Patel, V., and Kohner, E.M. The effect of acetazolamide on the retinal circulation. *Eye* 7: 697–702, 1993.
- Robin, A.L., and Covert, D. Does adjunctive glaucoma therapy affect adherence to the initial primary therapy? *Ophthalmology* 112: 863–868, 2005.
- Siesky, B., Harris, A., Ehrlich, R., et al. Short-term effects of brimonidine/timolol and dorzolamide/timolol on ocular perfusion pressure and blood flow in glaucoma. *Adv. Ther.* 29: 53–63, 2012.
- Silva, M.R.B.M., Rollo, H.A., and Schellini, S.A. Effect of brimonidine on the retrobulbar circulation in glaucomatous patients - a color Doppler study. *Arq. Bras. Oftalmol.* 64: 309–313, 2001.
- Stalmans, I., Sunaric Mégevand, G., Cordeiro, M.F., et al. Preservative-free treatment in glaucoma: who, when, and why. *Eur. J. Ophthalmol.* 23: 518–525, 2013.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., and Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.* 23: 146–189, 2003.
- Taki, K., Kato, H., Endo, S., et al. Cascade of acetazolamide-induced vasodilatation. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 103: 240–248, 1999.
- Toris, C.B., Gleason, M.L., Camras, C.B., et al. Effects brimonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Arch. Ophthalmol.* 113: 1514–1517, 1995.
- Van Buskirk, E.M., Bacon, D.R., and Fahrenbach, W.H. Ciliary vasoconstriction after topical adrenergic drugs. *Am. J. Ophthalmol.* 109: 511–517, 1990.
- Williamson, T.H., and Harris, A. Color Doppler ultrasound imaging of the eye and orbit. *Surv. Ophthalmol.* 40: 255–267, 1996.
- Zeitz, O., Galambos, P., Wagenfeld, L., et al. Glaucoma progression is associated with decreased blood flow velocities in the short posterior ciliary artery. *Br. J. Ophthalmol.* 90: 1245–1248, 2006.
- Zimmerman, T.J. Topical ophthalmic beta blockers: a comparative review. *J. Ocul. Pharmacol.* 9: 373–384, 1993.

## CAPÍTULO 3

### Caracterização do reflexo oculocardíaco durante a compressão do bulbo ocular em coelhos e cães da raça Beagle

#### Resumo

Esta pesquisa caracteriza a ocorrência do reflexo oculocardíaco (ROC) em coelhos e cães conscientes, observando o efeito do estímulo de compressão ocular sobre a frequência cardíaca (FC). Foram estudados trinta e quatro coelhos e 15 cães da raça Beagle, adultos e clinicamente saudáveis. O exame eletrocardiográfico (ECG) foi utilizado para gravar o ritmo cardíaco e FC continuamente. Pressão digital foi exercida sobre a pálpebra no olho direito, olho esquerdo e nos dois olhos simultaneamente por um minuto em cada etapa, com intervalos de um minuto entre cada compressão. Variações na FC foram observadas em cada minuto, contando os complexos no ECG. Não houve diferenças da FC entre as etapas sem compressão ocular, tanto nos coelhos como nos cães. A redução da FC foi estatisticamente significativa nos coelhos apenas quando ambos os olhos sofreram compressão ocular, em contraste com todas as fases sem compressão. Nos cães, uma redução da FC significativa foi observada durante a compressão apenas do olho direito ou olho esquerdo, em comparação com a FC basal, e também quando ambos os olhos sofreram compressão ocular concomitantemente, em comparação com os valores basais ou após a compressão do olho direito. Nos cães, a compressão dos olhos individualmente produziu alteração semelhante à observada durante a compressão de ambos os olhos simultaneamente. Este estudo mostra que o ROC pode ocorrer durante a compressão ocular experimental nos coelhos e cães da raça Beagle conscientes e caracteriza-se na redução da FC. O conhecimento dessa resposta fisiológica é importante para anestestistas e oftalmologistas veterinários durante cirurgias oftálmicas ou manipulações oculares.

**Palavras-chave:** cão, *Oryctolagus cuniculus*, compressão ocular, frequência cardíaca

#### Abstract

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). Thirty four clinically healthy adult rabbits and 15 clinically healthy adult Beagle dogs were studied. 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 one minute, with one minute intervals between each compression. Variations in HR were observed in each minute by counting complexes on the electrocardiographs. There were no differences in HR between stages without ocular compressions both in dogs and 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 of 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. 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, rabbit, oculocardiac reflex, ocular compression, heart rate

### 3.1 Introdução

O reflexo oculocardíaco (ROC) é a diminuição da frequência cardíaca (FC) em consequência à tração aplicada aos músculos extra-oculares ou compressão do bulbo ocular. Este reflexo foi descrito pela primeira vez em 1908 por Aschner e Dagnini (Aschner, 1908; Dagnini, 1908). Anatomicamente, o impulso aferente percorre os nervos ciliares longos e curtos até o gânglio ciliar, prosseguindo ao gânglio de Gasser, ao longo da divisão oftálmica do nervo trigêmeo, e termina no núcleo sensitivo principal do trigêmeo no assoalho do quarto ventrículo. O estímulo aferente atinge o núcleo motor visceral do nervo vago através de vias polissinápticas da formação reticular. O impulso eferente percorre o núcleo do nervo vago até o nervo vago e, chegando ao coração, estes estímulos vagais provocam respostas cronotrópicas e inotrópicas negativas (Walsh; Hoyt, 1969; Miller, 1982).

Em termos clínicos, o ROC é uma resposta fisiológica do coração para a estimulação física, ou do olho ou anexos oculares, caracterizada por diminuição na FC ou, em alguns casos, arritmias como as ventriculares e supraventriculares (Walsh; Hoyt, 1969; Blanc et al., 1983; Kerr; Vance, 1983).

Estas alterações do ritmo cardíaco podem ocorrer quando a divisão oftálmica do nervo trigêmeo é estimulada pela manipulação de estruturas oculares e perioculares (Koerbel et al., 2005), como consequência da tração durante manipulação dos músculos extraoculares, com ressecção muscular ou durante outras cirurgias oftálmicas (Singh et al., 2010).

O coelho da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) é um modelo biológico comum para a avaliação de novas tecnologias, bem como procedimentos oftalmológicos por seu grande tamanho do bulbo ocular, natureza dócil e menor custo de manejo em comparação com outras espécies. Esta espécie tem sido utilizada como modelo experimental animal para estudos sobre o ROC e oculorespiratório (Singh et al., 2010). Assim como os coelhos, os cães da raça Beagle são modelos biológicos populares na pesquisa científica por seu porte médio e temperamento igualmente dócil. Há pouca evidência de que esse reflexo é clinicamente significativo no cão (Ghaffari et al., 2009; Steinmetz et al., 2012), mas acredita-se que a pressão manual sobre os olhos podem realmente produzir alterações cardíacas nessa espécie (Clutton et al., 1988; Singh et al., 2010). Relatos de casos de trauma orbital e melanoma de coróide com extensão orbital descrevem

que a bradicardia foi observada como um sinal clínico e que provavelmente foi causada por ROC devido à deformação do bulbo e órbita, e consequente pressão do tecido local exercida pelo tumor, respectivamente (Ghaffari et al., 2009; Steinmetz et al., 2012).

Este reflexo foi citado em relatos de casos em cães na literatura veterinária e comumente na literatura médica, mas poucos estudos foram desenvolvidos nos últimos anos (Blanc et al., 1983; Clutton et al., 1988; Campbell et al., 1994; Ghaffari et al., 2009; Kim et al., 2012; Steinmetz et al., 2012). Existem muitos estudos anteriores sobre ROC, muitos utilizando estimulação elétrica e mecânica do nervo trigêmeo, mas apenas duas publicações demonstrando alterações na FC durante a compressão ocular em cães anestesiados e um em coelhos anestesiados (Joffe; Gay, 1966; Gandevia et al., 1978; Clutton et al., 1988; Singh et al., 2010). Este é um estudo pioneiro que foi realizado para caracterizar as variações de FC durante as compressões oculares e a ocorrência do ROC nos coelhos e cães conscientes.

### **3.2 Material e métodos**

A investigação foi realizada com 34 coelhos da raça Nova Zelândia clinicamente saudáveis, sendo 14 machos e 20 fêmeas, com seis meses de idade e peso de  $2,63 \pm 0,19$  kg (média  $\pm$  desvio padrão); e 15 cães da raça Beagle clinicamente saudáveis, sendo oito machos e sete fêmeas, com quatro anos de idade e peso de  $11,39 \pm 1,07$  kg. Todos os procedimentos realizados com os animais desta pesquisa estiveram de acordo com as normas do Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná.

A compressão ocular manual foi realizada exercendo pressão digital contínua com o polegar sobre a pálpebra superior, em cada um dos olhos separadamente e após, em ambos os olhos simultaneamente, durante um minuto, com intervalos livres entre cada minuto de compressão (Figura 3.1 e 3.2). Desta maneira, o experimento foi dividido em sete etapas consecutivas (Tabela 3.1).

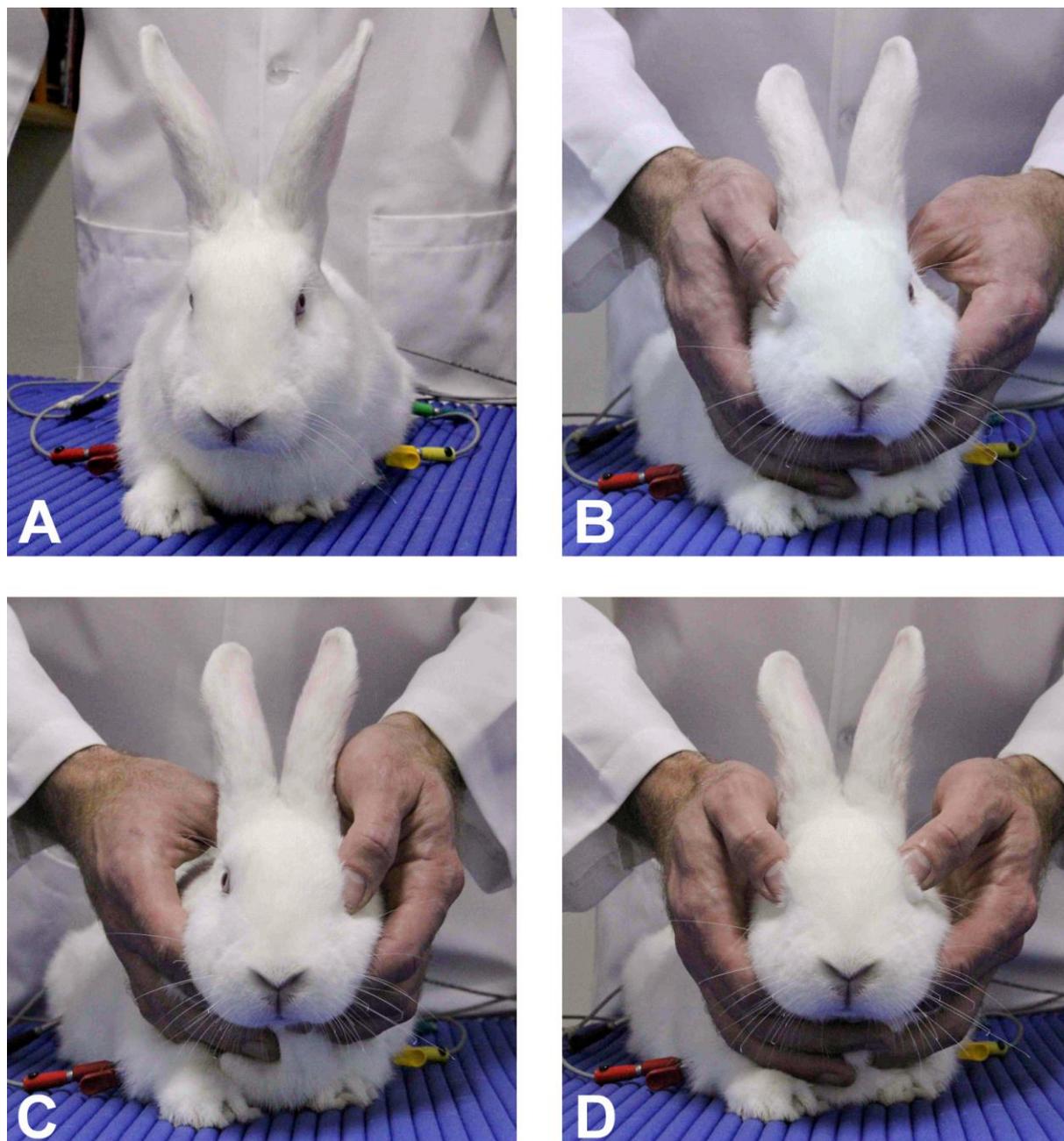


Figura 3.1 – Diferentes etapas da investigação do reflexo oculocardiaco demonstrado em um coelho da raça Nova Zelândia. Observe os eletrodos fixados diretamente sobre a pele para gravar o eletrocardiograma. A) Intervalo de um minuto entre cada compressão; apenas com delicada contenção física (Etapas 1, 3, 5 e 7). B) Compressão ocular por meio de pressão digital contínua com o polegar sobre a pálpebra direita (Etapa 2). C) Compressão ocular do olho esquerdo (Etapa 4). D) Compressão ocular de ambos os olhos simultaneamente (Etapa 6)

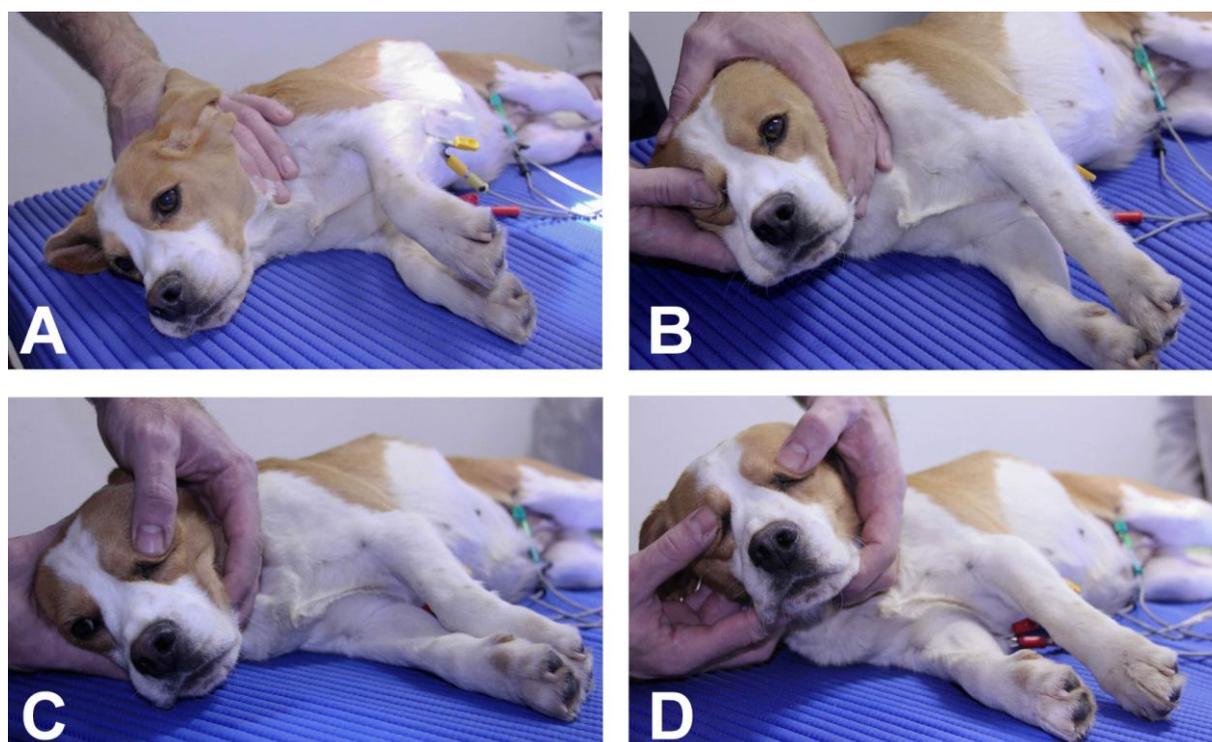


Figura 3.2 – Diferentes etapas da investigação do reflexo oculocardíaco demonstrado em um cão da raça Beagle. A) Intervalo de um minuto entre cada compressão; apenas com delicada contenção física (Etapas 1, 3, 5 e 7). B) Compressão ocular por meio de pressão digital contínua com o polegar sobre a pálpebra direita (Etapa 2). C) Compressão ocular do olho esquerdo (Etapa 4). D) Compressão ocular de ambos os olhos simultaneamente (Etapa 6)

**Tabela 3.1** Diferentes estágios em ordem cronológica da compressão ocular e pausas realizadas em coelhos da raça Nova Zelândia e cães da raça Beagle durante a investigação

Etapa	Intervalo (minutos)	Procedimentos
1	0-1	Contenção física delicada do corpo do animal, sem compressão ocular
2	1-2	Compressão no olho direito usando o polegar direito do investigador
3	2-3	Pausa, com contenção física delicada do corpo do animal; nenhuma compressão ocular é exercida
4	3-4	Compressão no olho esquerdo usando o polegar esquerdo do investigador
5	4-5	Pausa, com contenção física delicada do corpo do animal; nenhuma compressão ocular é exercida
6	5-6	Compressão de ambos os olhos simultaneamente
7	6-7	Contenção física delicada de corpo do animal, sem compressão ocular

Como em outros relatos anteriores em seres humanos e cães, nenhum instrumento foi utilizado para mensurar a pressão exercida sobre a superfície da pálpebra (Koerbel et al., 2005; Ghaffari et al., 2009; Clutton et al., 1988; Joffe; Gay, 1966; Gandevia et al., 1978). A pressão aplicada neste estudo foi empiricamente a força suficiente para causar deslocamento retrobulbar dos olhos e uma retração ocular mínima e discreta. Para evitar discrepâncias inter-investigadores, todas as compressões oculares foram realizadas pelo mesmo investigador.

Todas as etapas foram monitoradas pelo exame eletrocardiográfico (ECG) para avaliar e mensurar alterações na FC em cada etapa. O ECG foi realizado com um eletrocardiógrafo computadorizado (ECGP V6, TEB - Tecnologia Eletrônica Brasileira Ltda, São Paulo, SP, Brasil.). Os eletrodos utilizados foram do tipo “jacaré” sem dentes para reduzir o desconforto dos animais. Estes foram conectados às dobras da pele dos animais, e álcool foi aplicado para permitir uma melhor condução dos sinais elétricos. Durante o exame, os coelhos permaneceram em decúbito esternal e os cães em decúbito lateral direito. Os eletrodos foram colocados na altura dos cotovelos e joelhos.

O ECG foi realizado de forma contínua durante todo o procedimento em cada animal. A compressão ocular do olho direito (OD), olho esquerdo (OS), os olhos direito e esquerdo simultaneamente (OU) com as respectivas pausas entre compressões foram realizados no mesmo período de avaliação em cada coelho. O período de avaliação da FC por meio do ECG de cada animal foi cronologicamente dividido em sete diferentes etapas de um minuto de duração cada (três etapas com compressão ocular e quatro sem compressão) (Tabela 3.1). A FC foi calculada utilizando o número de complexos QRS gravados no ECG. Antes do início da gravação do ECG os eletrodos foram posicionados e cada espécie animal mantida em sua respectiva posição (Figuras 3.1 e 3.2) por contenção física delicada, esperando-se cinco minutos na mesma posição até o relaxamento do animal. A FC foi calculada utilizando a gravação de ECG durante as seguintes etapas de 1 minuto: Etapa 1 – sem compressão ocular; Etapa 2 – a compressão foi aplicada no OD com o polegar direito do investigador; Etapa 3 – sem compressão ocular; Etapa 4 – compressão aplicada no OS com o polegar esquerdo do investigador; Etapa 5 – sem compressão ocular; Etapa 6 – ambos os olhos com compressão simultaneamente (OU); Etapa 7 – sem compressão ocular.

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para demonstrar que os erros dos dados eram normalmente distribuídos. O foco das análises estatísticas foi comparar a FC nas etapas sem compressão ocular umas com as outras; as etapas com compressão ocular uma com as outras e com cada uma das etapas sem compressão ocular. Para isso, valores da FC foram analisados estatisticamente usando o *software StatView* (SAS Institute, Cary, NC, EUA) aplicando testes-*t* não pareados. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. As possíveis diferenças entre as espécies não foram exploradas.

### 3.3 Resultados

A média e o desvio-padrão dos valores da FC observados durante cada um das sete etapas, tanto para coelhos quanto cães, foram expressos em batimentos por minuto (bpm). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3 e Figuras 3.3 e 3.4.

Tabela 3.2 – Média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), valor máximo e mínimo da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto durante as etapas com e sem compressão ocular em 34 coelhos da raça Nova Zelândia

Etapa	Intervalo (minutos)	Procedimento	FC (bpm)				
			Média	DP	EP	Mínimo	Máximo
1	0-1	Sem compressão	257	28	5	173	317
2	1-2	Compressão OD	242	29	5	165	309
3	2-3	Sem compressão	248	27	5	190	295
4	3-4	Compressão OS	238	30	5	152	305
5	4-5	Sem compressão	245	26	4	169	310
6	5-6	Compressão OU	222	27	5	169	276
7	6-7	Sem compressão	251	31	5	176	321

Tabela 3.3 – Média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), valor máximo e mínimo da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto durante as etapas com e sem compressão ocular em 15 cães da raça Beagle

Etapa	Intervalo (minutos)	Procedimento	FC (bpm)				
			Média	DP	EP	Mínimo	Máximo
1	0-1	Sem compressão	128	18	4	93	157
2	1-2	Compressão OD	97	12	3	73	118
3	2-3	Sem compressão	115	22	6	79	148
4	3-4	Compressão OS	100	16	4	74	127
5	4-5	Sem compressão	110	18	4	76	139
6	5-6	Compressão OU	95	19	5	71	144
7	6-7	Sem compressão	114	18	5	90	146

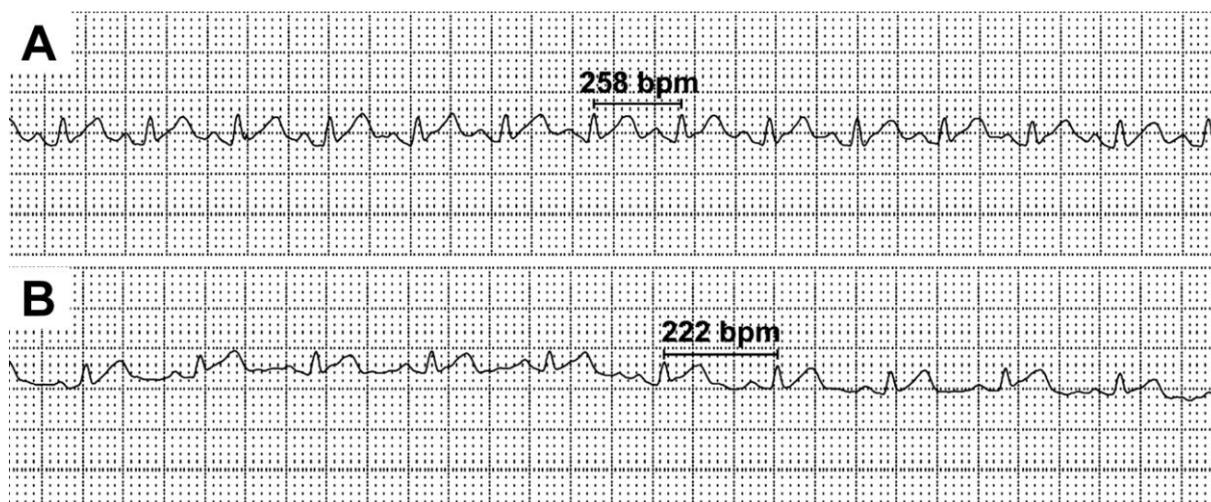


Figura 3.3 – Eletrocardiograma de um coelho da raça Nova Zelândia (derivação II, 50 mm/s, 20 mm/mV). A) Etapa 1, com ausência de compressão digital dos olhos, frequência cardíaca de 258 bpm. B) Etapa 6, com compressão digital de ambos os olhos simultaneamente, frequência cardíaca de 222 bpm

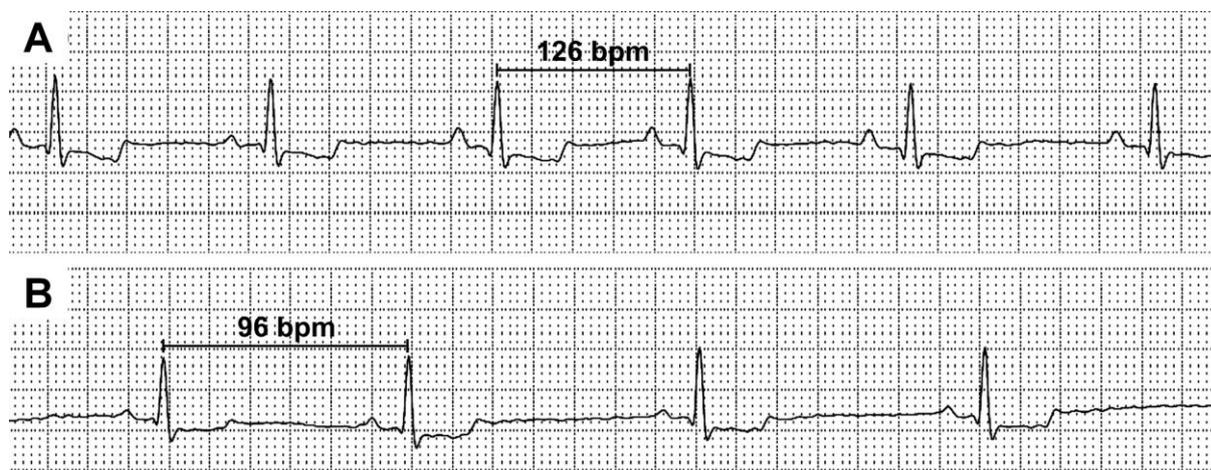


Figura 3.4 – Eletrocardiograma de uma cadela da raça Beagle (derivação II, 50 mm/s, 10 mm/mV). A) Etapa 1, com ausência de compressão digital dos olhos, frequência cardíaca de 126 bpm. B) Etapa 6, com compressão digital de ambos os olhos simultaneamente, frequência cardíaca de 96 bpm

Os coelhos permaneceram calmos durante todas as etapas do estudo e pareciam tolerar as compressões oculares muito bem, sem sinais de desconforto ocular ou físico. As médias da FC para as etapas sem compressão ocular e durante a compressão ocular estão demonstradas na Tabela 3.2. Não foram encontradas diferenças significativas entre estas etapas e os valores de  $P$  foram: Etapa 1 vs Etapa 3 ( $P=0,2$ ); Etapa 1 vs Etapa 5 ( $P=0,08$ ); Etapa 1 vs Etapa 7 ( $P=0,4$ ); Etapa 3 vs Etapa 5 ( $P=0,64$ ); Etapa 3 vs Etapa 7 ( $P=0,66$ ) e Etapa 5 vs Etapa 7 ( $P=0,37$ ). Os valores de FC entre as etapas com compressão ocular (OD vs OS; OD vs OU; OS vs OU) não foram significativamente diferentes ( $P>0,05$ ).

A compressão do OD e OS individualmente não produziu FC significativamente menor quando comparada com as etapas sem compressão ocular: Etapa 2 vs Etapa 1 ( $P=0,05$ ); Etapa 2 vs Etapa 3 ( $P=0,38$ ); Etapa 2 vs Etapa 5 ( $P=0,68$ ); Etapa 2 vs Etapa 7 ( $P=0,19$ ); Etapa 4 vs Etapa 1 ( $P=0,06$ ); Etapa 4 vs Etapa 3 ( $P=0,14$ ); Etapa 4 vs Etapa 5 ( $P=0,32$ ); Etapa 4 vs Etapa 7 ( $P=0,058$ ). Quando os dois olhos sofreram compressão simultaneamente (Etapa 6) o resultado da FC média foi significativamente diferente de todas as etapas que não sofreram compressão: Etapa 1 ( $P<0,0001$ ); Etapa 3 ( $P=0,0001$ ); Etapa 5 ( $P=0,0008$ ) e Etapa 7 ( $P<0,0001$ ).

Os cães se apresentavam tranquilos durante as etapas iniciais do estudo e a maioria deles parecia tolerar bem as compressões oculares. No entanto, ocasionalmente, alguns animais ficavam mais relutantes pela contenção física e desconfortáveis até o final do procedimento, especialmente durante a etapa de compressão ocular simultânea.

As médias da FC para as etapas sem compressão ocular e durante a compressão ocular estão demonstradas na Tabela 3.3. Não foram encontradas diferenças significativas entre estas etapas, e os valores de  $P$  encontrados foram: Etapa 1 vs Etapa 3 ( $P=0,05$ ); Etapa 1 vs Etapa 5 ( $P=0,08$ ), Etapa 1 vs Etapa 7 ( $P=0,07$ ); Etapa 3 vs Etapa 5 ( $P=0,45$ ); Etapa 3 vs Etapa 7 ( $P=0,9$ ) e Etapa 5 vs Etapa 7 ( $P=0,55$ ). A FC média das etapas com compressão ocular (OD vs OS; OD vs OU; OS vs OU) não foram significativamente diferentes ( $P>0,05$ ).

A compressão do OD isoladamente não produziu média da FC significativamente diferente das etapas que não sofreram compressão (Etapas 3, 5 e 7), exceto para a Etapa 1 ( $P<0,0001$ ). O mesmo ocorreu com a compressão do OS, que não produziu média da FC significativamente diferente quando comparadas com as etapas que não sofreram compressão (Etapas 3, 5 e 7), com exceção para a Etapa 1 ( $P<0,0001$ ).

Quando ambos os olhos sofreram compressão simultânea (Etapa 6), o resultado da FC média foi significativamente menor do que as duas primeiras etapas que não sofreram compressão: Etapa 1 ( $P<0,0001$ ) e Etapa 3 ( $P=0,0021$ ), demonstrado na Tabela 3.3.

### 3.4 Discussão e conclusão

As poucas pesquisas publicadas sobre compressão ocular e caracterização do ROC foram realizadas em cães e coelhos anestesiados (Joffe; Gay, 1966; Gandevia et al., 1978; Singh et al., 2010). A presente investigação demonstrou a ocorrência de ROC em duas espécies de animais conscientes. A avaliação desta resposta sem anestesia é importante, pois é plausível inferir que a maioria dos protocolos anestésicos pode interferir e modular o ROC (Blanc et al., 1983; Oh et al., 2007; Chung et al., 2008; Singh et al., 2010).

Em ambas as espécies estudadas, coelhos e cães, a média da FC durante as etapas sem compressão ocular (Etapas 1, 3, 5 e 7) não foram estatisticamente diferentes entre si. A Etapa 1 de cada animal foi considerada como o valor basal da FC, e as outras etapas (Etapas 3, 5 e 7) como o tempo de recuperação da FC após a compressão ocular, uma vez que não foi significativamente diferente do valor basal.

A redução significativa da FC foi observada nos coelhos apenas quando ambos os olhos sofreram compressão simultaneamente. A quantidade de força e consequente estímulo, secundário à compressão de cada olho, individualmente, não foi suficiente para causar ROC. Quando as forças exercidas pelo investigador durante a compressão em ambos os olhos foram combinadas, o reflexo ocorreu. Em um estudo anterior sobre ROC, que comparou a compressão de um olho com a compressão de ambos os olhos, mostrou que o último teve um efeito maior na redução da FC do que o anterior (Joffe; Gay, 1966). Pode-se conceber que nos coelhos a compressão ocular bilateral pode causar maior estímulo do nervo trigêmeo e, portanto, uma diminuição mais intensa da FC.

Nos cães deste estudo, o ROC produzido pela compressão do OD isoladamente (Etapa 2) pode ter interferido na resposta à compressão do OS, que por sua vez, pode ter interferido na resposta subsequente à compressão dos dois olhos simultaneamente (OU). Um estudo com crianças mostrou que quando os estímulos são repetidos não há fadiga e escape vagal e, portanto, a resposta esperada seria um aumento da FC e não uma diminuição (Blanc et al., 1983). Neste estudo, demonstrou-se que a fadiga da resposta ao ROC depende do período de tempo durante o qual o núcleo central do vago permanece relativamente refratário à estimulação repetitiva (Blanc et al., 1983). Esta fadiga reduz a intensidade da

diminuição da FC, encurtando o intervalo de tempo para o escape vagal após uma segunda estimulação (Blanc et al., 1983). No presente estudo, o intervalo de um minuto entre cada etapa de compressão ocular pode ter sido tempo suficiente para a FC retornar totalmente a FC basal antes da próxima compressão. Certamente a fadiga em resposta ao ROC e o tempo de recuperação devem ser mais bem estudados no futuro.

Não foram observadas quaisquer outras alterações no ritmo cardíaco, exceto a diminuição da FC. Alguns estudos têm relatado bradicardia e arritmias durante procedimentos cirúrgicos (particularmente oftálmicos e faciais) em pacientes anestesiados (seres humanos e animais) (Clutton et al., 1988; Ghaffari et al., 2009; Singh et al., 2010) com um relato de parada cardíaca em um ser humano em 1956 envolvendo a realização de correção cirúrgica para estrabismo (Ohashi et al., 1986). Uma possível explicação para este fato é a redução do escape vagal mediada pela medicação anestésica. O escape vagal está relacionado com a velocidade com que o núcleo motor do vago tende a tornar-se refratário ao estímulo contínuo (Blanc et al., 1983). O escape vagal secundário ao ROC é um mecanismo fisiológico de defesa contra a estimulação vagal excessiva. Quando o ser humano ou o animal é submetido à anestesia geral, este mecanismo de defesa pode estar alterado ou até mesmo abolido, dependendo da droga anestésica ou drogas utilizadas (Blanc et al., 1983). Este possível efeito sinérgico com drogas anestésicas poderia explicar o porquê de o animal consciente apresentar poucas alterações no ritmo cardíaco produzidas pela estimulação vagal e por qual motivo o animal anestesiado pode apresentar ROC mais pronunciado.

Neste estudo nenhuma técnica foi utilizada para mensurar objetivamente a pressão exercida pelo polegar durante a compressão ocular. O mesmo procedimento empírico de compressão digital também foi realizado em outros estudos anteriores (Joffe; Gay, 1966; Gandevia et al., 1978; Clutton et al., 1988; Ghaffari et al., 2009; Singh et al., 2010). Mesmo que existam métodos mais objetivos de medir a compressão ocular, a maioria deles envolve procedimentos invasivos que deve ser realizado sob anestesia, como citado na literatura (Laurence; Schelegel, 1966). Naturalmente, a utilização de uma variável subjetiva (compressão digital) dificulta a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos de ROC em diferentes espécies, já que a quantidade de força aplicada por cada pesquisador é

impossível de determinar. No entanto, considerando essas limitações, o presente estudo é o primeiro a registrar a ocorrência do ROC em coelhos e cães conscientes.

Nesta pesquisa, o ROC foi demonstrado em coelhos e cães conscientes. Não foi observada redução da FC suficiente para ser considerada clinicamente perigosa em coelhos ou cães da raça Beagle saudáveis. Há a possibilidade de que os animais com doenças cardíacas ou outras possam ter variação da FC diferente ou mesmo maior do que animais saudáveis. Além disso, o efeito de várias drogas anestésicas no ROC também necessita investigação. A monitorização do ECG é altamente recomendada durante procedimentos cirúrgicos a fim de permitir o reconhecimento de arritmias cardíacas secundárias ao ROC, especialmente quando o olho é manipulado, para assim, assessorar o anestesista.

### 3.5 Referências

Aschner, B. Ober einen bisher noch nicht beschriebenen reflex vom auge auf kreislauf und atmung. *Wiener klinische Wochenschrift*; 21:1529–1530, 1908. –

Blanc, V.F., Hardy, J.F., and Milot, J. The oculo-cardiac reflex: A graphic and statistical analysis in infants and children. *Can. J. Anaesth.* 30:360–369, 1983.

Campbell, R., Rodrigo, D., and Cheung, L. Asystole and bradycardiaduring maxillofacial surgery. *Anesth. Prog.* 41:13–16, 1994.

Chung, C.J., Lee, J.M., Choi, S.R., et al. Effect of remifentanil on oculocardiac reflex in paediatric strabismus surgery. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 52:1273–1277, 2008.

Clutton, R.E., Boyd, C., Richards, D.L.S., et al. Significance of the oculocardiac reflex during ophthalmic surgery in the dog. *J. Small Anim. Pract.* 29:573–579, 1988.

Dagnini, G. Interne ad un riflesso provocato in alcuni emiplegici colin stimolo della cornea e Célia pressione sul bulbo oculare. *Boll. Sci. Med.* 8:380–381, 1908.

Gandevia, S.C., McCloskey, D.I., and Potter, E.K. Reflex bradycardia occurring in response to diving, nasopharyngeal stimulation and ocular pressure, and its modification by respiration and swallowing. *J. Phys.* 276:383–394, 1978.

Ghaffari, S.M., Marjani, M., and Masoudifard, M. Oculocardiac reflex induced by zygomatic arch fracture in a crossbreed dog. *J. Vet. Card.* 11:67–69, 2009.

Joffe, W.S., and Gay, A.J. The oculorespiratory cardiac reflex in the dog. *Invest. Ophthalmol.* 5:550–554, 1966.

Kerr, W.J., and Vance, J.P. Oculocardiac reflex from the empty orbit. *Anaesthesia* 38:883–385, 1983.

Kim, B.B., Qaqish, C., Frangos, J., et al. Oculocardiac reflex induced by an orbital floor fracture: report of a case and review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 70:2614–2614, 2012.

Koerbel, A., Gharabaghi, A., Samii, A., et al. Trigemino-cardiac reflex during skull base surgery: mechanism and management. *Acta Neurochir.* 147:727–733, 2005.

Laurence, C., and Schelegel, W.A. Ophthalmic pulse studies. Influence of intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol.* 5:515–525, 1966.

Miller, N.A. *Clinical Neuro-Ophthalmology*. Ed 4. Baltimore, Williams & Wilkins, 1982, pp. 1050-1055.

Oh, A.Y., Yun, M.J., Kim, M.J., et al. Comparison of desflurane with sevoflurane for the incidence of oculocardiac reflex in children undergoing strabismus surgery. *Br. J. Anaesth.* 99:262–265, 2007.

Ohashi, T., Kase, M., and Yokoi, M. Quantitative analysis of oculo-cardiac reflex by traction on human extraocular muscle. *Invest. Ophthalmol.* 27:1160–1164, 1986.

Singh, J., Roy, S., Mukherjee, P., et al. Influence of topical anesthetics on oculocardiac reflex and corneal healing in rabbits. *Int. J. Ophthalmol.* 3:14–18, 2010.

Steinmetz, A., Ellenberger, K., März, I., et al. Oculocardiac reflex in a dog caused by a choroidal melanoma with orbital extension. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 48:66–70, 2012.

Walsh, F.B., and Hoyt, W.F. *Clinical Neuro-Ophthalmology*. Ed 3. Baltimore, Williams & Wilkins, pp 379–82, 1969.

## CAPÍTULO 4

### Crescimento dos cílios induzido pelo uso tópico de análogos da prostaglandina: bimatoprost, tafluprost, travoprost e latanoprost em coelhos

#### Resumo

Os análogos da prostaglandina (APGs) são agentes hipotensores oculares utilizados para o tratamento do glaucoma. Em seres humanos a hipertricose dos cílios foi relatada como um efeito colateral do uso destes agentes e este crescimento foi investigado em pessoas que utilizavam bimatoprost. Poucos relatos sobre crescimento dos cílios durante o tratamento do glaucoma com outros APGs são encontrados na literatura. Neste trabalho foi investigado o efeito no comprimento dos cílios de quatro diferentes APGs de uso tópico ocular. Quarenta coelhos da raça Nova Zelândia foram divididos em quatro grupos e receberam por quatro semanas aplicação tópica diária no olho esquerdo de bimatoprost, tafluprost, travoprost e latanoprost. O olho direito não recebeu tratamento. O comprimento dos cílios foi medido em ambos os olhos, antes e após o tratamento usando um paquímetro digital. Os animais que receberam bimatoprost e tafluprost tiveram aumentos significativos no comprimento dos cílios. Não foi observado crescimento significativo dos cílios nos coelhos que receberam travoprost e latanoprost após um mês de tratamento. Atualmente apenas a bimatoprost é aprovada para o uso como estimulante do crescimento dos cílios, mas esta pesquisa mostra que a tafluprost poderia ser mais bem explorada pela indústria cosmética e farmacêutica. Novas pesquisas com períodos de tratamento prolongados utilizando travoprost e latanoprost como agentes para o crescimento dos cílios devem ser realizadas para determinar se estes APGs podem induzir o crescimento dos cílios, além de investigar outros possíveis efeitos colaterais.

**Palavras-chave:** oftalmologia, hipertricose, *Oryctolagus cuniculus*

#### Abstract

Prostaglandin analogues are ocular hypotensive agents used for the treatment of glaucoma. Hypertrichosis of the eyelashes have 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 prostaglandin analogues are also found in the literature. We investigated the effect of four different topical prostaglandin analogues on eyelash length. Forty New Zealand white rabbits were divided into four groups and received daily topical application of bimatoprost, tafluprost, travoprost and latanoprost in left eye for four weeks. The right eye received no treatment. Eyelash length was measured in both eyes before and after treatment using a stainless steel digital caliper. Bimatoprost and tafluprost groups had significant increases in eyelash length. We did not observe significant eyelash growth in rabbits receiving travoprost and latanoprost after one month of treatment. 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 prostaglandin analogues induce eyelash growth, and investigate other possible side effects.

**Keywords:** ophthalmology, hypertrichosis, *Oryctolagus cuniculus*

## 4.1 Introdução

Os cílios, além de proporcionar aos olhos barreira de proteção natural contra corpos estranhos, também possuem função estética (Law, 2010; Smith et al., 2012). Na sociedade moderna, cílios longos e volumosos são considerados atributo físico desejável para as mulheres e um sinal de feminilidade e beleza (Shaikh; Bodla, 2006).

Desde o início da utilização dos análogos da prostaglandina (APGs) como agentes hipotensores oculares para o tratamento do glaucoma, a hipertricose dos cílios foi relatada como efeito colateral (Law, 2010; Wand, 1997; Holló, 2007). Atualmente, o análogo da prostaglandina (APG) denominado bimatoprost, na concentração de 0,03%, além de ser utilizado para reduzir a pressão intraocular (PIO) também está aprovado para fins cosméticos para aumentar o comprimento e espessura dos cílios em pacientes saudáveis e em pacientes com hipotricose palpebral. Para isso, o medicamento é aplicado topicamente na pele das margens palpebrais (Allergan, 2009; Law, 2010; Smith et al., 2012).

A bimatoprost, a tafluprost, a travoprost e a latanoprost compartilham muitas semelhanças, tanto estruturais como farmacológicas (Law, 2010) e assim, estes APGs podem causar efeitos similares sobre o crescimento dos cílios. Diversos estudos com seres humanos tratados para glaucoma relataram qualitativamente o crescimento dos cílios, apenas como um efeito colateral (Johnstone, 1997; Noecker et al., 1999; Gandolfi et al., 2001; Netland et al., 2001; Sherwood; Brandt, 2001; Easthope; Perry, 2002; Eisenberg et al., 2002; Higginbotham et al., 2002; Stecchi et al., 2002; Uusitalo et al., 2010; Swymer; Neville, 2012). No entanto, apenas bimatoprost e latanoprost foram previamente estudados em ensaios clínicos que avaliaram quantitativamente e especificamente o crescimento dos cílios em seres humanos (Sugimoto; Uji, 2002; Akhyari et al., 2008; Faghihi et al., 2009; Roseborough et al., 2009; Fagien, 2010; Law, 2010; Wester et al., 2010; Smith et al., 2012). O crescimento de pelos foi investigado em modelos animais, mas o efeito dos APGs especificamente sobre o crescimento dos cílios ainda não foi estudado (Uno et al., 2002; Sasaki et al., 2005; Woodward et al., 2013).

Este é o primeiro estudo que compara o crescimento dos cílios secundário ao uso tópico destes APGs em grupo homogêneo de animais. Nesta pesquisa

objetivou-se avaliar e discutir os efeitos no comprimento dos cílios do uso tópico de quatro APGs em coelhos da raça Nova Zelândia.

## 4.2 Material e métodos

A pesquisa foi realizada com 40 coelhos clinicamente saudáveis da raça Nova Zelândia de seis meses de idade (*Oryctolagus cuniculus*), sendo 19 machos e 21 fêmeas, com peso médio de  $2,66 \pm 0,03$  kg (média  $\pm$  desvio padrão). Os animais foram selecionados aleatoriamente e adquiridos de criatório comercial. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná.

O exame físico foi realizado antes da avaliação oftálmica para excluir animais com qualquer suspeita de doença sistêmica. As estruturas oculares de todos os animais foram avaliadas utilizando transiluminador e biomicroscópio de lâmpada de fenda (Hawk Eye; Dioptrix, L'Union, França). Coelhos com qualquer evidência de doenças oftálmicas foram excluídos da pesquisa. Para evitar discrepâncias inter-investigadores, o mesmo investigador realizou os testes oculares. O outro investigador instilou cada um dos colírios.

Os coelhos foram divididos em quatro grupos de 10 animais cada de acordo com cada droga em estudo. Apenas o olho esquerdo de cada animal foi tratado com a aplicação tópica, diária, durante quatro semanas consecutivas, instilando-se uma gota do colírio de APG a ser testado em seu respectivo grupo. Os medicamentos oftálmicos utilizados em cada grupo foram: Grupo 1 – Bimatoprost 0,03% contendo cloreto de benzalcônio (BAK) como conservante (Lumigan<sup>®</sup> colírio, Allergan Indústria Farmacêutica Ltda., Guarulhos, SP); Grupo 2 – Tafluprost 0,0015% sem conservante (Saflutan<sup>®</sup> colírio, Merck Sharp & Dohme Ltda., Guarulhos, SP); Grupo 3 – Travoprost 0,004% com BAK (Travatan<sup>®</sup> colírio, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP); Grupo 4 – Latanoprost 0,005% com BAK (Xalatan<sup>®</sup> colírio, Pfizer Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP). A mesma proporção de machos e fêmeas (cinco machos e cinco fêmeas) foi observada em cada grupo, com exceção do Grupo 2 (tafluprost) que apresentou quatro machos e seis fêmeas, resultado da seleção aleatória aplicada. Os olhos direito permaneceram sem tratamento ao longo do estudo.

Os olhos esquerdos e direitos foram avaliados no dia anterior e após 30 dias do início do tratamento. A avaliação foi realizada após contenção física (manual) dos coelhos tomando o devido cuidado de manter os animais confortáveis durante as mensurações.

O comprimento dos cílios de ambos os olhos esquerdo e direito foram mensurados por meio de um paquímetro digital com display LCD de aço inoxidável (PD-150, 0-150 mm, precisão: 0,01 mm; Vonder, Curitiba, PR) a partir da base da margem palpebral até a extremidade dos cílios. A região central da pálpebra superior foi determinada pela mensuração do comprimento horizontal total da pálpebra e dividindo-se este número resultante por dois, localizando, assim, o centro da pálpebra. A região central foi mensurada em seis milímetros de comprimento, sendo três do centro da pálpebra superior para cada lado, nasal e temporal (Figura 4.1). Os cílios desta área central são naturalmente maiores que os outros localizados na região nasal e temporal nos coelhos. Os cinco cílios mais longos foram selecionados na região central da pálpebra superior em cada coelho, e o comprimento foi mensurado antes e após o tratamento.

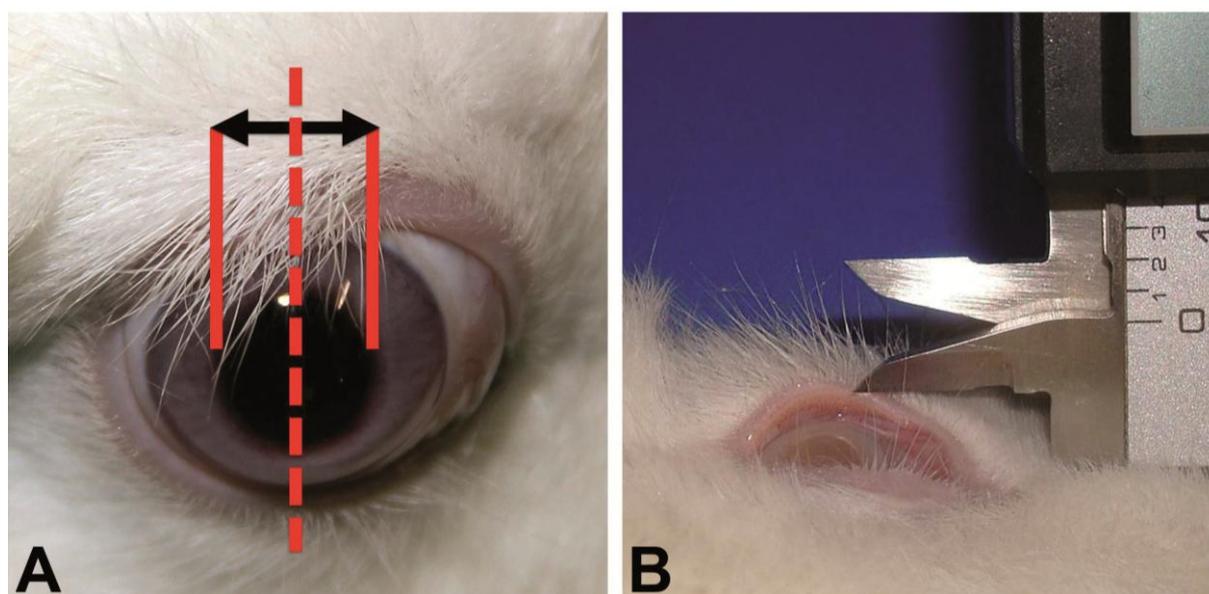


Figura 4.1 – Procedimento de medição de cílios sendo demonstrado no olho esquerdo de um coelho da raça Nova Zelândia. A) Cinco cílios mais longos foram selecionados a partir da região central da pálpebra superior (6 mm de comprimento - seta preta). B) Mensuração de um cílio na região central da pálpebra superior, com um paquímetro digital de aço inoxidável

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado para demonstrar que os dados foram normalmente distribuídos. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do *software StatView* (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Foi aplicado o teste-*t*

pareado para comparar possíveis diferenças entre resultados do comprimento dos cílios dos olhos esquerdos (tratados) e olhos direitos (não tratados) após o tratamento; e ANOVA 2-way e Tukey-Kramer como pós teste para comparar potenciais diferenças entre os dados finais do olho esquerdo das drogas no pós-tratamento.

### 4.3 Resultados

A média, desvio padrão, erro padrão e coeficiente de variação dos valores dos comprimentos dos cílios, expressos em milímetros (mm) no pré e pós-tratamento com cada droga investigada estão demonstrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP) e coeficiente de variação (CV) dos valores dos comprimentos dos cílios na região central da palpebral superior expressos em milímetros, com valor de *P* das comparações entre pré e pós-tratamento com análogos da prostaglandina (OS) e olho não tratado (OD) em coelhos da raça Nova Zelândia

Grupo	Olho	Tratamento	Média		DP		EP		CV		Valor de <i>P</i>
			Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré vs Pós
1	OS	Bimatoprost 0,03%	9,50	11,99	1,09	1,02	0,35	0,32	0,11	0,09	< 0,0001*
	OD	Sem tratamento	9,31	9,38	1,04	1,03	0,33	0,32	0,11	0,11	0,88
2	OS	Tafloprost 0,0015%	9,97	11,03	1,01	1,08	0,32	0,34	0,10	0,10	0,036*
	OD	Sem tratamento	10,08	10,11	1,04	0,87	0,33	0,28	0,10	0,09	0,95
3	OS	Travoprost 0,004%	10,16	11,32	1,57	1,70	0,50	0,54	0,15	0,15	0,133
	OD	Sem tratamento	9,90	9,92	1,63	1,73	0,51	0,55	0,16	0,17	0,98
4	OS	Latanoprost 0,005%	9,70	10,51	0,97	0,81	0,31	0,26	0,10	0,08	0,058
	OD	Sem tratamento	9,65	9,77	0,94	0,93	0,30	0,29	0,10	0,10	0,78

\*Diferença significativa ( $P < 0,05$ )

A comparação no pré-tratamento do comprimento dos cílios dos olhos esquerdos de todos os grupos não foram significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ), mostrando que os grupos podem ser considerados homogêneos antes do tratamento. Após o tratamento com os APGs, todos os grupos demonstraram uma tendência a aumentar os valores médios do comprimento dos cílios, porém este aumento foi realmente significativo somente nos animais tratados com bimatoprost e tafloprost ( $P < 0,0001$  e  $P = 0,036$ , respectivamente). Não foram encontradas diferenças significativas no comprimento dos cílios nos coelhos que receberam travoprost e latanoprost, comparando os valores do pré e pós-tratamento ( $P = 0,133$  e  $P = 0,058$ , respectivamente) (Tabela 4.1). Além disso, a comparação dos

valores do pós-tratamento entre os animais dos grupos tratados com bimatoprostá e tafluprostá não foi estatisticamente significativa ( $P=0,382$ ). Não houve diferença significativa no comprimento dos cílios entre machos e fêmeas quando comparado pré e pós-tratamento ( $P>0,05$ ). As médias dos valores do comprimento dos cílios dos olhos direito (que não receberam tratamento) de todos os animais não apresentaram diferença significativa entre o pré e pós-tratamento ( $P>0,05$ ) (Tabela 4.1).

Não foram detectados sinais clínicos de irritação oftálmica, tais como secreção mucosa aumentada, blefaroespásmo, blefaroedema, pigmentação ou congestão conjuntival e palpebral após o tratamento.

#### **4.4 Discussão e conclusão**

Vários estudos que visaram avaliar o efeito dos APGs em seres humanos com glaucoma mencionaram como curiosidade ou apenas como uma observação subjetiva alguns efeitos colaterais destes medicamentos sobre os cílios, como o aumento do seu crescimento, número, comprimento, espessura, curvatura e pigmentação (Easthope; Perry, 2002; Eisenberg et al., 2002; Higginbotham et al., 2002; Swymer; Neville, 2012). Até a publicação destes estudos, o objetivo principal da avaliação da ação dessas drogas APGs acima mencionadas era se estavam reduzindo a PIO. O delineamento experimental e análise estatística empregados para demonstrar o crescimento dos cílios não eram claros ou mencionados. Adicionalmente, o crescimento dos cílios era descrito apenas de forma qualitativa e nunca quantitativamente (Gandolfi et al., 2001; Netland et al., 2001; Sherwood; Brandt, 2001; Uusitalo et al., 2010). Posteriormente, a bimatoprostá e a latanoprostá foram mais bem estudadas em seres humanos, com avaliação quantitativa e específica para o crescimento dos cílios (Sugimoto; Uji, 2002; Akhyari et al., 2008; Faghihi et al., 2009; Roseborough et al., 2009; Fagien, 2010; Law, 2010; Wester et al., 2010; Smith et al., 2012). Como resultado de tais pesquisas, foi lançada no comércio uma formulação tópica de bimatoprostá 0,03% específica para o crescimento de cílios (Latisse®, Allergan, Irvine, CA).

O método utilizado para medir o crescimento dos cílios em coelhos não foi detalhado por nenhum outro estudo em animais. Neste estudo, os cinco cílios mais longos da região palpebral central foram escolhidos no pré e pós-tratamento, pois foi

notado que os cílios desta região são naturalmente mais longos. Supôs-se que a maioria, se não todos os cílios escolhidos em ambas as ocasiões, eram os mesmos. Ainda se os cílios reavaliados no pós-tratamento fossem diferentes dos mensurados anteriormente, estes seriam os mais longos e ainda seria um forte indicativo de crescimento causado pela droga.

A solução de bimatoprost 0,03% (Latisse®, Allergan, Irvine, CA) é o único produto prescrito aprovado pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América para estimular o crescimento dos cílios (Allergan, 2009). Esta pesquisa mostra que tafluprost 0,0015% tem efeitos similares aos da bimatoprost 0,03% na questão do crescimento dos cílios de coelhos após 30 dias de tratamento diário.

Nas condições da presente pesquisa, travoprost e latanoprost não aumentaram significativamente o comprimento dos cílios, embora valores mais elevados foram encontrados no período pós-tratamento. Em seres humanos com glaucoma, tratados com latanoprost também foi observada ligeira tendência de aumento no comprimento dos cílios, porém sem diferença significativa (Noecker et al., 1999; Stecchi et al., 2002). Estas citações corroboraram com o resultado desta pesquisa. No entanto, outros estudos com seres humanos mostraram que a latanoprost aumenta significativamente o comprimento dos cílios (Sugimoto; Uji, 2002; Casson; Selva, 2005). Talvez, as diferenças nas condições experimentais, espécies estudadas (seres humanos frente a animais) e duração do tratamento possam ser responsáveis por estas diferenças de resultados.

Um mês de tratamento consiste em tempo suficiente para demonstrar diferenças de crescimento dos cílios em coelhos que receberam bimatoprost e tafluprost, mas não para promover diferença no comprimento dos cílios em coelhos que receberam travoprost e latanoprost. Em alguns estudos com APGs em seres humanos, os tratamentos se estendiam por mais de três meses (Johnstone, 1997; Gandolfi et al., 2001; Netland et al., 2001; Sherwood; Brandt, 2001; Easthope; Perry, 2002; Higginbotham et al., 2002; Stecchi et al., 2002; Uusitalo et al., 2010). Considerando este fato, possivelmente uma das limitações desta investigação foi o curto período de tratamento.

Outros efeitos secundários supostamente causados nos seres humanos por APGs incluem hiperemia conjuntival, aumento de pigmentação da íris, pigmentação da pálpebra e, em casos raros, pigmentação periocular (Johnstone, 1997; Doshi et al., 2006; Holló, 2007). A hiperpigmentação pode ocorrer dentro de três a oito

semanas após o início do tratamento em seres humanos (Johnstone, 1997; Priluck; Fu, 2010). Alguns pesquisadores sugerem que o início mais rápido da hiperpigmentação da pele periocular pode ocorrer com a aplicação direta do APG na pálpebra (Priluck; Fu, 2010). O aparecimento de hiperemia conjuntival, hiperpigmentação da pele e eritema da pálpebra são os eventos adversos mais comuns causados pela solução de bimatoprost 0,03% (Latisse®, Allergan, Irvine, CA) e estes efeitos secundários foram observados em outro estudo com seres humanos diagnosticados com hipertensão ocular e tratados com colírios de latanoprost, travoprost, tafluprost e bimatoprost por mais de três meses (Inoue et al., 2012). Provavelmente todos APGs utilizados nesta pesquisa podem causar efeitos semelhantes se forem utilizados por longo período de tempo, tanto na forma de instilação na superfície ocular, como na solução aplicada à margem da pálpebra superior. Outros sinais, tais como eritema das pálpebras e hiperemia da conjuntiva também foram observados nestes estudos citados anteriormente. As alterações relacionadas à pigmentação não puderam ser avaliadas neste presente estudo, pois os coelhos da raça Nova Zelândia da cor branca são albinos e não apresentam quaisquer células pigmentadas. Dando continuidade a esta pesquisa, caberia em um estudo futuro o desenvolvimento de novas soluções contendo tafluprost para serem aplicadas sobre a margem das pálpebras superiores, para avaliar possíveis efeitos colaterais.

Com base no desejo por cílios mais longos, grossos e escuros como sinal de feminilidade e beleza na maioria das culturas, foi testado nesta pesquisa se outro APG é uma alternativa para aqueles que procuram melhorar a aparência dos cílios. Portanto, o colírio de tafluprost 0,0015% pode promover o crescimento dos cílios de forma semelhante ao colírio de bimatoprost 0,03% em coelhos quando utilizados uma vez ao dia durante 30 dias.

## 4.5 Referências

Akhyari, M., Jafari, A.K., Seyrafi, H., *et al.* Latanoprost for the treatment of alopeci areata of eyelashes. *Ir. J. Dermatol.* 1:7–10, 2008.

Allergan, Inc. Latisse™ (Bimatoprost Ophthalmic Solution) 0.03% Prescribing Information. 2009; Irvine, CA: Allergan Inc.

Casson, R.J., and Selva, D. Lash ptosis caused by latanoprost. *Am. J. Ophthalmol.* 139:932–933, 2005.

Doshi, M., Edward, D.P., and Osmanovic, S. Clinical course of bimatoprost-induced periocular skin changes in Caucasians. *Ophthalmology* 113:1961–1967, 2006.

Easthope, S., and Perry, C. Topical bimatoprost: a review of its use in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs & Aging.* 19:231–248, 2002.

Eisenberg, D., Toris, C., and Camras, C. Bimatoprost and travoprost: a review of recent studies of two new glaucoma drugs. *Surv. Ophthalmol.* 47:S105–S115, 2002.

Faghihi, G., Andalib, F., and Asilian, A. The efficacy of latanoprost in the treatment of alopecia areata of eyelashes and eyebrows. *Eur. J. Dermatol.* 19:586–597, 2009.

Fagien, S. Management of hypotrichosis of the eyelashes: Focus on bimatoprost. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 3:39–48, 2010.

Gandolfi, S., Simmons, S., Sturm, R., *et al.* Three-month comparison of bimatoprost and latanoprost in patients with glaucoma and ocular hypertension. *Adv. Ther.* 18:110–121, 2001.

Higginbotham, E., Feldman, R., Stiles, M., *et al.* Latanoprost and timolol combination therapy vs monotherapy. One-year randomized trial. *Arch. Ophthalmol.* 120:915–922, 2002.

Holló, G. The side effects of the prostaglandin analogues. *Expert. Opin. Drug. Saf.* 6:45–52, 2007.

Inoue, K., Shiokawa, M., Higa, R., *et al.* Adverse periocular reactions to five types of prostaglandin analogs. *Eye (Lond)* 26:1465–1472, 2012.

Johnstone, M.A. Hypertrichosis and increased pigmentation of eyelashes and adjacent hair in the region of the ipsilateral eyelids of patients treated with unilateral topical latanoprost. *Am. J. Ophthalmol.* 124:544–547, 1997.

Law, S.K. Bimatoprost in the treatment of eyelash hypotrichosis. *Clin. Ophthalmol.* 4:349–58, 2010.

Netland, P., Landry, T., Sullivan, K., *et al.* Travoprost compared with latanoprost and timolol in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Am. J. Ophthalmol.* 132:472–484, 2001.

Noecker, R., Bulau, S., and Schwiegerling, J. Xalatan-induced changes in periocular skin pigmentation and lash dimensions measured using a digital imaging technique. *Invest. Ophthalmol.*; 40:S832, 1999.

Priluck, J.C., and Fu, S. Latisse-induced periocular skin hyperpigmentation. *Arch. Ophthalmol.* 128:792–793, 2010.

Roseborough, I., Lee, H., Chwalek, J., *et al.* Lack of efficacy of topical latanoprost and bimatoprost ophthalmic solutions in promoting eyelash growth in patients with alopecia areata. *J. Am. Acad. Dermatol.* 60:705–706, 2009.

Sasaki, S., Hozumi, Y., and Kondo, S. Influence of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and its analogues on hair regrowth and follicular melanogenesis in a murine model. *Exp. Dermatol.* 14:323–328, 2005.

Shaikh, M.Y. and Bodla, A.A. Hypertrichosis of the eyelashes from prostaglandin analog use: a blessing or a bother to the patient? *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 22:76–77, 2006.

Sherwood, M., and Brandt, J. Six-month comparison of bimatoprost once-daily and twice-daily with timolol twice-daily in patients with elevated intraocular pressure. *Surv. Ophthalmol.* 45:S361–S368, 2001.

Smith, S., Fagien, S., Whitcup, S.M. *et al.* Eyelash growth in subjects treated with bimatoprost: a multicenter, randomized, double-masked, vehicle-controlled, parallel-group study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66:801–806, 2012.

Stecchi, G., Saccucci, S., Molinari, S., *et al.* Eyelash hypertrichosis induced by topical latanoprost: 6-month follow-up. *Acta. Ophthalmol. Scand.* 236:56–57, 2002.

Sugimoto, M., and Uji, Y. Quantitative analysis of eyelash lengthening following topical latanoprost therapy. *Can. J. Ophthalmol.* 37:342–345, 2002.

Swymer, C., and Neville, M.W. Tafluprost: The first preservative-free prostaglandin to treat open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Ann. Pharmacother.* 46:1506–1510, 2012.

Uno, H., Zimbric, M.L., Albert, D.M., *et al.* Effect of latanoprost on hair growth in the bald scalp of the stump-tailed macaque: a pilot study. *Acta. Derm. Venereol.* 82:7–12, 2002.

Uusitalo, H., Pillunat, L.E., and Ropo, A. Efficacy and safety of tafluprost 0.0015% versus latanoprost 0.005% eye drops in open-angle glaucoma and ocular hypertension: 24-month results of a randomized, double-masked phase III study. *Acta Ophthalmologica* 88:12–19, 2010.

Wand, M. Latanoprost and hyperpigmentation of eyelashes. *Arch. Ophthalmol.* 115:1206–1208, 1997.

Wester, S.T., Lee, W.W., and Shi, W. Eyelash growth from application of bimatoprost in gel suspension to the base of the eyelashes. *Ophthalmology* 117:1024–1031, 2010.

Woodward, D.F., Tang, E.S., Attar, M., *et al.* The biodisposition and hypertrichotic effects of bimatoprost in mouse skin. *Exp. Dermatol.* 22:145–148, 2013.

## ANEXOS E APÊNDICES

### 5.1 Aprovação no Comitê de Ética do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná



**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.

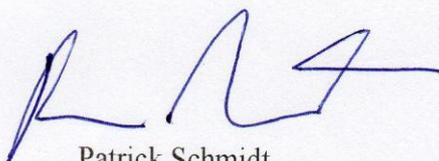
Curitiba, 20 de março de 2013.

Of. No. 017/2013, CEUA-SCA

Para: Leandro Lima  
Assunto: Protocolo 011/2011

Prezado Leandro Lima

Em relação ao projeto sob sua responsabilidade, avaliado por esta Comissão sob o protocolo número 011/2011 e intitulado "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 imunohistoquímica e histomorfométrico", vimos através deste informar que a nova metodologia foi incluída ao projeto inicial, sendo válido o mesmo certificado emitido anteriormente.

Patrick Schmidt  
PresidenteRosangela Locatelli Dittrich  
Vice-PresidenteComissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná

CIENTE: \_\_\_\_\_

Leandro Lima  
ProponenteDATA: 06/08 / 13

## 5.2 Artigo científico publicado na revista *Veterinary Ophthalmology: Characterization of the oculocardiac reflex during compression of the globe in Beagle dogs and rabbits.*

*Veterinary Ophthalmology* (2013) 1–7

DOI:10.1111/vop.12077

### 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 Sciences, 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.<sup>1,2</sup> 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.<sup>3</sup> 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.<sup>3–5</sup>

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

### 5.3 Artigo científico publicado na revista *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: Eyelash growth induced by topical prostaglandin analogues, bimatoprost, tafluprost, travoprost, and latanoprost in rabbits.*

JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS  
Volume 00, Number 0, 2013  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/jop.2013.0075

ORIGINAL ARTICLE

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

Amália Turner Giannico,<sup>1</sup> Leandro Lima,<sup>1</sup> Heloisa Helena Abil Russ,<sup>2</sup> and Fabiano Montiani-Ferreira<sup>1</sup>

### 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.<sup>1,2</sup> In modern society, longer and fuller eyelashes are considered a desirable physical attribute on women and a sign of femininity and beauty.<sup>3</sup>

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.<sup>1,4,5</sup> 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.<sup>1,2,6</sup>

Bimatoprost, tafluprost, travoprost, and latanoprost share many similarities both structurally and pharmacologically<sup>1</sup> 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.<sup>7-17</sup> However, only bimatoprost and latanoprost have been studied in clinical trials with human beings that assessed quantitatively and specifically the eyelash growth.<sup>1,2,18-23</sup> Body hair growth, but not eyelash growth has been investigated in animal models.<sup>24-26</sup> 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  $2.66 \pm 0.03$  kg

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Graefe de Oftalmologia, Curitiba, Brazil.

## 5.4 Artigo científico publicado na Revista do CRMV: Leucismo em Sabiá-Laranjeira.

Artigo Técnico

# Leucismo em Sabiá-Laranjeira



Sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*) em atividade de alimentação de filhote no Setor de Ciências Agrárias da UFPR, Curitiba (PR). É possível notar que se trata de caso clássico de leucismo, uma vez que bico, íris, pele ao redor do bico e pés apresentam pigmentação normal, e todas as penas são brancas.

O sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*) é uma ave popular no Brasil, sendo considerada como um verdadeiro símbolo nacional.

A ocorrência de aves com plumagens aberrantes não é um evento raro, embora seja pouco documentado. O leucismo, muitas vezes denominado erroneamente de albinismo, é definido como a perda parcial ou total de melanina, que na natureza ocorre em uma frequência inferior a 1% (Franz e Fleck, 2009). Nas aves essa alteração ocorre nas penas, sendo que bico, olhos, pele e pés geralmente apresentam-se com pigmentação normal (van Grouw, 2006). As causas desse fenômeno não são bem esclarecidas, citando-se influências ambientais, presença de alelos mutantes ou divergências na expressão de genes, que acabam impedindo a pigmentação das penas (Bensch et al., 2000; Gonçalves Junior et al., 2008).

Um espécime de sabiá-laranjeira com todas as penas brancas foi observado no Câmpus I – Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), na cidade de Curitiba (PR). Sua identificação foi realizada por meio da morfologia externa, vocalização e da observação da interação com outros sabiás-laranjeiras de coloração normal. Este pássaro realizou pareamento com indivíduo de coloração normal, nidificação com produção de um filhote não leucístico

e foi caracterizado como fêmea. Foi observado durante cerca de um ano e nenhum outro pássaro leucístico foi identificado no mesmo câmpus. Com essas informações seria impossível fazer inferências sobre o modo pelo qual o leucismo é transmitido geneticamente nesta espécie, e há apenas escassos relatos informais da ocorrência de leucismo em sabiás, porém poucas publicações. Na cidade de Curitiba, somente em 1990, Veiga e Pardo relataram um caso de leucismo em um sabiá-laranjeira, que na época foi classificado como albinismo.

As aves portadoras de leucismo tornam-se mais susceptíveis a ataques por parte de indivíduos da mesma espécie, e por este motivo apresentam redução na expectativa de vida (Gonçalves Junior et al., 2008). Além deste fato, o leucismo pode torná-las mais vulneráveis à predação, por permanecerem mais expostas na natureza (Collins, 2003). No presente caso, esse evento não foi observado, visto que o animal convive em harmonia com as aves da mesma espécie, como apontado em alguns casos de leucismo, onde as aves sobrevivem e se reproduzem com sucesso por longos períodos (Forrest e Naveen, 2000).

Os registros do acompanhamento de casos ocorridos na natureza são raros, dificultando maiores investigações. Considerando esse fato, descrevemos um caso em que a referida ave convive com outros indivíduos da espécie, visando à descrição futura dos padrões de comportamento reprodutivo, para avaliação das possíveis causas e efeitos do leucismo. Consideramos importante a diferenciação de leucismo e albinismo na natureza, e o conhecimento de médicos veterinários e biólogos sobre este evento genético ainda desconhecido. ●

Agradecimentos: Aos funcionários da UFPR que auxiliaram na observação do espécime. Ao ornitólogo Pedro Scherer Neto pelos esclarecimentos sobre o caso.

### Referências

- BENSCH, S.; HANSSON, B.; HASSELDUIST, D.; NIELSEN, B. Partial albinism in a semi-isolated population of great reed warblers. **Hereditas**, v. 133, n. 2, p. 167-170, 2000.
- COLLINS, C.T. A leucistic Willet in California. **Western Birds**, v. 34, n. 2, p. 118-119, 2003.
- FORREST, S.C.; NAVEEN, R. Prevalence of leucism in pygocelid Penguins of the Antarctic peninsula. **Waterbirds**, v. 23, n. 2, p. 283-285, 2000.
- FRANZ, I.; FLECK, R. Dois casos de leucismo em quero-quero *Vanellus chilensis* (Molina, 1782) no sul do Brasil. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 161-164, 2009.
- GONÇALVES JUNIOR, C.C.; SILVA, E.A. DE LUCA, A.C.; PONGILUPPI, T.; MOLINA, F.B. Record of a leucistic Rufous-bellied Thrush *Turdus rufiventris* (Passeriformes, Turdidae) in São Paulo city, Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 16, n. 1, p. 72-75, 2008.
- VAN GROUW, H. Not every white bird is an albino: sense and nonsense about colour aberrations in birds. **Dutch Birding**, v. 28, n. 2, p. 79-89, 2006.
- VEIGA, L.A.; PARDO, E. Ocorrência de um caso de albinismo em sabiá laranjeira. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, n. 2, p. 329-333, 1990.

Amália Turner Giannico | amaliaturner@uol.com.br  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - UFPR

Rogério Ribas Lange | Professor DMV-UFPR  
Jaqueline Ditttrich | Acadêmica de Biologia - UFPR

Leandro Lima | Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - UFPR  
Fabiano Montiani-Ferreira | Professor DMV-UFPR

5.5 Artigo científico publicado na revista PUBMED: Parâmetros eletrocardiográficos de tigras-d'água norte-americanas (*Trachemys scripta elegans*) em duas temperaturas corporais”.

GIANNICO, A.T. et al. Parâmetros eletrocardiográficos de tigras-d'água norte-americanas (*Trachemys scripta elegans*) em duas temperaturas corporais. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 24, Ed. 211, Art. 1405, 2012.



**PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.**

**Parâmetros eletrocardiográficos de tigras-d'água norte-americanas  
(*Trachemys scripta elegans*) em duas temperaturas corporais**

---

Amália Turner Giannico<sup>1</sup>, André Tavares Somma<sup>2</sup>, Leandro Lima<sup>3</sup>, Simone Tostes de Oliveira<sup>4</sup>, Rogério Ribas Lange<sup>5</sup>, Ramiro Moura Tavares Tyszka<sup>2</sup>, Flávia Biondi<sup>1</sup>,  
Fabiano Montiani-Ferreira<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Med. Veterinária, Mestranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, (amaliagiannico@yahoo.com.br), (flabiondi@hotmail.com)

<sup>2</sup> Med. Veterinário, Residente de Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (andresomma@gmail.com); (ramiro.tyszka@gmail.com)

<sup>3</sup> Med. Veterinário, M.Sc, Professor Substituto de Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, (leandrolimavet@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Med. Veterinária, D.Sc., Professora de Clínica Médica de Pequenos Animais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, (simonetostes@ufpr.br)

<sup>5</sup> Med. Veterinário, M.Sc., Professor de Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (rrlange@ufpr.br)

<sup>6</sup> Med. Veterinário, PhD, Professor de Clínica Médica de Pequenos Animais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba

---

## 5.6 Artigo científico publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira: Valores eletrocardiográficos em saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*).

Pesq. Vet. Bras. 33(7):937-941, julho 2013

### Valores eletrocardiográficos em saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*)<sup>1</sup>

Amália T. Giannico<sup>2\*</sup>, André T. Somma<sup>2</sup>, Rogério R. Lange<sup>2</sup>, James N.B.M. Andrade<sup>3</sup>, Leandro Lima<sup>2</sup>, Andressa C. Souza<sup>2</sup> e Fabiano Montiani-Ferreira<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Giannico A.T., Somma A.T., Lange R.R., Andrade J.N.B.M., Lima L., Souza A.C. & Montiani-Ferreira F. 2013. [Electrocardiographic values in marmosets (*Callithrix penicillata*).] Valores eletrocardiográficos em saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(7):937-941. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil. E-mail: amaliagiannico@uol.com.br

Knowledge of cardiac parameters in experimental animal models is essential for comparative medical research. Our study aimed to establish electrocardiographic parameters and reference values for marmosets (*Callithrix penicillata*). Nineteen healthy adult marmosets were used. A combination of tiletamine and zolazepam was used for chemical restrained before performing electrocardiography (ECG). A computerized ECG machine was used. Values of the ECG parameters were a mean heart rate of 264±74 beats/min, a variation MCA between 60° and -90°, a mean P wave duration of 34±6ms and amplitude of 0.132±0.051mV, a mean PR interval duration of 56±11ms, a mean QRS complex duration of 35±7ms and amplitude of 0.273±0.269mV, a mean QT interval duration 130±26ms, ST segment was isoelectric (13 animals) and with elevation (six animals) and a mean T wave amplitude of 0.19±0.083mV and positive. There was no significant difference between males and females. Thus, the electrocardiographic parameters obtained in our study in marmosets can be used as a reference values to in other future researches, providing researchers electrocardiographic parameters that contribute with the literature.

INDEX TERMS: Primate, marmoset, *Callithrix penicillata*, cardiology, electrocardiography.

**RESUMO.**- O conhecimento de parâmetros cardíacos em animais modelo experimentais é essencial para a investigação médica comparativa. Nosso estudo teve como objetivo estabelecer parâmetros eletrocardiográficos e valores de referência para saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*). Dezenove saguis-de-tufo-preto adultos saudáveis foram utilizados. Uma combinação de tiletamina e zolazepam foi empregada para contenção química antes da realização do exame eletrocardiográfico (ECG). Foi utilizado para o exame de ECG um equipamento computadorizado. Os valores dos parâmetros do ECG encontrados foram frequência cardíaca média de 264±74 bpm, uma variação do eixo cardí-

aco médio entre 60° e -90°, a duração da onda P média de 34±6ms e amplitude de 0,132±0,051mV, um intervalo PR com duração de 56±11ms, duração média do complexo QRS de 35±7ms e amplitude de 0,273±0,269mV, duração do intervalo QT de 130±26ms, segmento ST isoelétrico (13 animais) e com supradesnível (seis animais) e uma amplitude de onda T de 0,19±0,083mV e com polaridade positiva. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas. Os parâmetros eletrocardiográficos obtidos em nosso estudo em saguis-de-tufo-preto podem ser utilizados como referência em outras pesquisas futuras, oferecendo aos pesquisadores parâmetros eletrocardiográficos que contribuem com a literatura.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Primata, saguis-de-tufo-preto, *Callithrix penicillata*, cardiologia, eletrocardiograma.

#### INTRODUÇÃO

Os primatas em geral apresentam a anatomia cardíaca e vascular muito semelhante às dos seres humanos e tem

<sup>1</sup> Recebido em 8 de dezembro de 2012.

Aceito para publicação em 2 de maio de 2013.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brasil.

\*Autor para correspondência: amaliagiannico@uol.com.br

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC 88520-000, Brasil.

## 5.7 VITA

A aluna Amália Turner Giannico, matriculada na Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, nestes dois anos desenvolveu como primeira autora, juntamente com seu orientador Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira, oito artigos científicos enviados para publicação em revistas internacionais e nacionais. No ano de 2012, o artigo “Leucismo em Sabiá-Laranjeira” foi publicado na Revista do CRMV e o artigo “Parâmetros eletrocardiográficos de tigras-d’água norte-americanas (*Trachemys scripta elegans*) em duas temperaturas corporais” foi publicado na revista PUBMED. No ano de 2013, além dos dois artigos “*Characterization of the oculocardiac reflex during compression of the globe in Beagle dogs and rabbits*” e “*Eyelash growth induced by topical prostaglandin analogues, bimatoprost, tafluprost, travoprost, and latanoprost in rabbits*” publicados nas revistas *Veterinary Ophthalmology* e *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, referentes aos capítulos 3 e 4 desta dissertação, o artigo “Valores eletrocardiográficos em saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*)” foi publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira. Neste início de 2014, o artigo “*Proven cardiac changes during death-feigning (tonic immobility) in rabbits (Oryctolagus cuniculus)*” foi aceito para publicação na revista *Journal of Comparative Physiology A*. Outro artigo está sendo avaliado no *Journal of Exotic Pet Medicine*, onde se encontra em sua terceira revisão, com poucas correções para publicação. Este artigo denominado “*Determination of normal echocardiographic, electrocardiographic and radiographic cardiac parameters in the conscious New Zealand white rabbit*” foi desenvolvido utilizando dados adquiridos nas pesquisas com todos os coelhos. Na revista Semina: Ciências Agrárias, o artigo “Medidas ecocardiográficas de 19

cavalos de tração da região metropolitana de Curitiba-PR” está em processo de correções, com provável aceite.

Outras pesquisas foram realizadas utilizando os mesmos coelhos referidos nesta dissertação, e a aluna participou do artigo “*Increased corneal sensitivity following Schirmer tear test compared to standardized endodontic paper point tear test in New Zealand white rabbits*” que foi aceito com correções na revista *Veterinary Ophthalmology*. Além deste, outros artigos foram desenvolvidos em parceria com colegas do mestrado, como o artigo intitulado “*Pigmentary uveitis associated with iridociliary cysts in American Bulldogs*” submetido na revista *Archives of Veterinary Science*; o artigo “*The eye of the red-eared slider turtle: morphologic observations and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests*” enviado para a revista *Veterinary Ophthalmology* e o artigo “*Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits in Brazil*” para a revista *Veterinary Parasitology*.

A dissertação proporcionou um estudo que gerou grande quantidade de material científico, que por sua vez resultará no desenvolvimento de mais cinco artigos científicos, com pretensão de envio para revistas internacionais no ano de 2014. Durante o decorrer do mestrado, a aluna cooperou em projetos de Iniciação Científica/PIBIC da UFPR auxiliando as alunas orientadas pelo Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira): Clara Alita Corona Ponczek; Fátima Aparecida de Lara e Andreise Costa Przydzimirski. Além disso, colaborou também para a escrita e envio do artigo “Perfil dos pesquisadores bolsistas de produtividade científica em Medicina Veterinária do CNPq, Brasil” para a revista *Archives of Veterinary Science*, estudo este realizado em conjunto com a aluna de iniciação científica Clara Alita Corona Ponczek e o Prof. Fabiano Montiani-Ferreira.