

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

MANUELLA OLIVEIRA BORGES DE SAMPAIO

**EFEITOS DO USO TÓPICO DO CONSERVANTE CLORETO DE BENZALCÔNIO  
E CICLOSPORINA NA CONJUNTIVA DE COELHOS - ESTUDO  
HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO.**

CURITIBA – PR  
2017

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

**EFEITOS DO USO TÓPICO DO CONSERVANTE CLORETO DE BENZALCÔNIO  
E CICLOSPORINA NA CONJUNTIVA DE COELHOS - ESTUDO  
HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO.**

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

Orientador: Professor Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA – PR  
2017

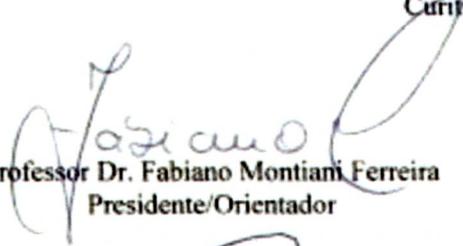
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**



**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“EFEITOS DO USO TÓPICO DO CONSERVANTE CLORETO DE BENZALCÔNIO E CICLOSPORINA NA CONJUNTIVA DE COELHOS - ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO”** apresentada pela Mestranda **MANUELLA OLIVEIRA BORGES DE SAMPAIO** 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 ADIA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 29 de março de 2017

  
Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira  
Presidente/Orientador

  
Dra. Heloisa Helena Abil Russ  
Membro

  
Professor Dr. Peterson Triches Dornbusch  
Membro

*Ao meu avô, João Cândido, grande incentivador  
dos meus estudos, sempre buscando me auxiliar  
no que fosse preciso...Saudades eternas...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFPR, Universidade pela qual me sinto acolhida e considero como minha segunda casa.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante esses dois anos de pesquisa.

À Dra. Núbia Vanessa dos Anjos Lima Henrique de Faria, pela parceria na pesquisa e apoio financeiro conseguido por meio da UNIFESP.

À Dra. Heloisa Helena Abil Russ, uma das idealizadoras desse projeto no qual exerceu importante orientação e apoio, principalmente por se tratar de uma das maiores autoridades na pesquisa sobre superfície ocular e glaucoma. Agradeço também pela aceitação em ser membro desta banca.

Ao Prof. Dr. Peterson Triches Dornbusch, por aceitar participar desta banca e pelos ensinamentos durante as aulas cursadas no mestrado, as quais com certeza me ajudaram a produzir esta dissertação.

Ao Dr. Leandro Lima, pelo apoio no decorrer deste projeto, principalmente na fase experimental, me auxiliando nos pequenos detalhes devido à sua experiência no tratamento dos coelhos.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, especialmente ao Carlos Fernandes da Silva, que me ajudou no transporte dos coelhos para o biotério, e às funcionárias da limpeza pelo auxílio na limpeza e desinfecção do mesmo após o término da fase experimental.

Agradeço às queridas amigas e médicas veterinárias, Nathália Mendonça de Seabra e Gabriela Nassar Viapiana, pela incansável ajuda nas aplicações dos colírios e limpeza diária do biotério durante os 30 dias corridos de experimento, sem as quais eu não teria conseguido sozinha. Assim como também agradeço às médicas veterinárias e amigas, Mariza Bortolini, Christiane Montenegro, Thayane C. Vieira, Karina Souza e Camilla Bolmann, tanto pela ajuda na parte prática da pesquisa quanto pela amizade e apoio psicológico nesses dois anos.

À equipe do Laboratório de Patologia da PUC-PR: Ana, Marina, Seigo e professora Lúcia de Noronha, pela amizade e auxílio técnico na preparação de material histológico e análise das amostras, sempre demonstrando muita paciência durante meu aprendizado.

Ao meu namorado Gustavo Wiziack Silva, que sem medir esforços sempre me ajudou quando precisei, me apoiando e me compreendendo nos momentos de minha ausência e cansaço, sendo um dos maiores incentivadores dos meus estudos.

À minha família, pai, mãe, irmãos e sobrinhos, também pela compreensão em momentos os quais não pude estar presente, assim como pela colaboração nos horários que exigiam silêncio e concentração. Obrigada pelo suporte e carinho nestes dois anos.

Por fim, porém não menos importante, agradeço especialmente ao meu querido orientador, Professor Fabiano Montiani-Ferreira, a quem devo toda a minha evolução profissional e todo o meu aprendizado na área de Oftalmologia Veterinária, sempre me direcionando para os caminhos mais corretos. Obrigada pelo exemplo transmitido, por todo o apoio nesses anos de convivência e por dividir seu conhecimento sempre com tanta competência e paciência.

## RESUMO

A presente dissertação de mestrado buscou contribuir com informações sobre os efeitos tóxicos do conservante cloreto de benzalcônio (BAK) tópico na conjuntiva de coelhos e o possível “efeito protetor” da ciclosporina 0,05% nessa toxicidade, particularmente no que diz respeito à ação dessas drogas sobre as células caliciformes, fibrose tecidual, inflamação do endotélio vascular, estimulação da angiogênese, além da ativação de linfócitos T reativos.

O primeiro capítulo aborda o estudo histomorfométrico da conjuntiva em amostras coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido periódico de Schiff (PAS) e a análise da ação do BAK unicamente sobre as células caliciformes e a neovascularização do tecido inflamado, assim como a ação da ciclosporina sobre esses parâmetros.

O segundo capítulo aborda a avaliação imuno-histoquímica das alterações induzidas pelo BAK e a possível inibição dessas alterações pela ciclosporina, analisando a indução de fibrose tecidual pela expressão de colágeno tipo I e III, a expressão de vasos sanguíneos reativos por meio do anticorpo anti-VCAM-1 e a expressão de linfócitos T reativos por meio do anticorpo anti-CD45RO.

O objetivo do estudo foi oferecer uma alternativa de tratamento que atenuie os efeitos deletérios da inflamação crônica causada pelos conservantes presentes em colírios no tratamento contínuo do glaucoma (mais especificamente o BAK), comprovando que a ciclosporina possui ação positiva em alguns dos parâmetros estudados.

**Palavras-chave:** BAK, ciclosporina, glaucoma, fibrose, células caliciformes, linfócitos T reativos, neovascularização.

## ABSTRACT

This dissertation sought to investigate the toxic effects of topical benzalkonium chloride (BAK) on the conjunctiva of rabbits and a possible “protective effect” for the use of cyclosporine 0.05% against this toxicity, particularly with respect to the action of these drugs on goblet cells, tissue fibrosis, inflammation of vascular endothelium, stimulation of angiogenesis, and activation of reactive T lymphocytes.

The first chapter is a classic histomorphometric study of the conjunctiva in samples stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and PAS and the analysis of the BAK activity only on goblet cells and the neovascularization of the inflamed tissue, as well as the action of cyclosporine on these parameters.

The second chapter is an immunohistochemical evaluation of BAK-induced changes and the possible inhibition of these alterations by cyclosporine, analyzing the induction of tissue fibrosis by the expression of collagen type I and III, the expression of reactive blood vessels by anti- VCAM-1 and the expression of reactive T lymphocytes by the anti-CD45RO antibody.

The objective of the study was to investigate and perhaps to offer a treatment alternative that would alleviate the deleterious effects of chronic inflammation caused by preservatives present in eye drops in the continuous treatment of glaucoma (more specifically BAK), proving that cyclosporine has a positive preventing activity in some of the toxic effects studied.

**Key-words:** BAK, cyclosporine, glaucoma, fibrosis, goblet cells, reactive T lymphocytes, neovascularization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Exemplo representativo de um bulbo ocular após enucleação e corte sagital, com seus anexos após a fixação em formaldeído e posterior corte longitudinal. .... 20

Figura 1.2. Lâmina com uma amostra de bulbo ocular corada em HE. Observe que toda a conjuntiva bulbar e conjuntiva palpebral foi incluída no corte longitudinal para serem analisadas. .... 21

Figura 1.3. Fotomicrografias (400x) representativas dos tecidos conjuntivais de coelhos após 30 dias de tratamento, coradas com PAS para destacar as células caliciformes as quais estão indicadas pelas setas vermelhas. A Foto "A" refere-se a um olho do Grupo 2, tratado apenas com ciclosporina 0,05%; A foto "B" refere-se a um olho do Grupo 1, tratado com BAK 0,1%; e a foto "C" refere-se a um olho do Grupo 3, tratado com ciclosporina + 0,1% BAK 0,05%. Observe a escassez de células caliciformes após o tratamento com BAK, tanto nas fotos B como C. Na foto B ainda é possível observar metaplasia do epitélio conjuntival e infiltrado inflamatório subjacente devido à ação do BAK. Todas as amostras de tecido conjuntival foram retiradas do mesmo local (conjuntiva palpebral). .... 23

Figura 1.4. Gráfico evidenciando as médias da contagem de células caliciformes por campo (400x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS). Nota-se a proximidade das médias dos grupos 1(BAK) e 3(BAK + ciclosporina), tanto nos olhos controles quanto nos olhos tratados, sugerindo pouca influência da ciclosporina na proteção das células caliciformes. 24

Figura 1.5. Médias do número de vasos sanguíneos por campo (400x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS). Nota-se redução significativa da média do Grupo 2 e 3 em relação ao Grupo 1 nos olhos tratados. .... 26

Figura 1.6. Comparação clínica e histológica entre os olhos esquerdos de cada grupo após 30 dias de tratamento com fotomicrografias representativas demonstrando a contagem de vasos sanguíneos por campo (100x) em cortes corados com HE. "A" e "B" correspondem ao Grupo 1 (BAK), "C" e "D" correspondem ao Grupo 2 (ciclosporina) e "E" e "F" correspondem ao Grupo 3 (BAK + ciclosporina). .... 26

Figura 2. 1. Exemplo representativo de um bloco doador com um dos olhos em corte longitudinal para a confecção das lâminas de TMA. A: Vazador rotatório elétrico utilizado para a coleta dos fragmentos das áreas conjuntivais a serem analisadas. B: Área coletada abrangendo a conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival de uma das pálpebras. As setas vermelhas e círculos pontilhados indicam as quatro regiões a serem coletadas da conjuntiva de coelhos, abrangendo a conjuntiva bulbar, fórnice conjuntival e conjuntiva palpebral de ambas as pálpebras. .... 45

Figura 2. 2. A: Exemplo de uma lâmina de TMA e a sequência dos fragmentos palpebrais para cada um dos cinco coelhos de cada grupo para a análise do tecido conjuntival. Os fragmentos identificados como “1” e “3” correspondem à conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival de cada pálpebra (superior e inferior), assim como os fragmentos “2” e “4” correspondem à conjuntiva palpebral (magnificação: 2,5x). B: Exemplo de um dos fragmentos abrangendo a conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival e substância própria, em maior aumento (magnificação: 5x). .... 46

Figura 2. 3. A: Fotomicrografia (20x) de um dos campos selecionados de um fragmento conjuntival em uma lâmina de TMA marcada com o anticorpo anti-colágeno I. A coloração marrom no tecido corresponde às fibras de colágeno I marcadas com o anticorpo. B: Utilização do software @Image Pro plus 4 sobre a fotomicrografia para realçar em vermelho o colágeno I marcado. O amarelo corresponde ao tecido não marcado e o verde corresponde às áreas de ausência de tecido, assim como algumas regiões em branco. A proporção se estabeleceu da relação entre a quantidade de objetos marcados em vermelho e o total de tecido da amostra (objetos em vermelho + objetos em amarelo) = objetos vermelhos/ (objetos vermelhos + amarelos) x 100, dando em porcentagem a quantidade de colágeno I marcado por campo. .... 48

Figura 2. 4. Fotomicrografias dos campos em aumento de 200 x de amostras marcadas com anticorpo anti-VCAM-1 (A) e anti-CD45RO (B). Na foto “A”, a coloração marrom presente na parede dos vasos e estroma subjacente indica positividade para o VCAM-1, marcando vasos sanguíneos reativos. Na foto “B”, a coloração marrom escura indica positividade para o CD45RO, marcando os linfócitos T reativos. Utilizou-se o software de edição Zen 2.3 para a seleção dos campos e contagem, tanto dos vasos quanto dos linfócitos, os quais estão identificados com um “x” vermelho, sendo os totais identificados no canto superior esquerdo de cada foto (9 e 49 respectivamente). .... 49

Figura 2. 5. Médias das porcentagens de colágeno tipo I por campo (200x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS). .... 51

Figura 2. 6. Médias das porcentagens de colágeno tipo III por campo (200x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS).  
..... 53

Figura 2. 7. Médias do número de vasos sanguíneos reativos marcados nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS). Nota-se redução significativa da média do Grupo 2 e 3 em relação ao Grupo 1 nos olhos tratados..... 54

Figura 2. 8. Comparação clínica e histológica entre os olhos esquerdos de cada grupo após 30 dias de tratamento com fotomicrografias representativas demonstrando a contagem de vasos sanguíneos reativos (setas vermelhas) por campo (200x) marcados com o anticorpo anti-VCAM-1. "A" e "B" correspondem ao Grupo 1 (BAK), "C" e "D" correspondem ao Grupo 2 (ciclosporina) e "E" e "F" correspondem ao Grupo 3 (BAK + ciclosporina). ..... 55

Figura 2. 9. Médias do número de linfócitos T reativos marcados por campo (200x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS)..... 57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de células caliciformes por campo (400x) em cada grupo e seus respectivos controles: ..... 23

Tabela 1.2. Comparação das médias da contagem de células caliciformes por campo (400x) entre seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. .... 24

Tabela 1.3. Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de vasos sanguíneos por campo (400x) em cada grupo e seus respectivos controles:..... 25

Tabela 1.4. Comparação das médias da contagem de vasos sanguíneos entre seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos..... 27

Tabela 2. 1. Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da porcentagem de colágeno tipo I por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles:..... 51

Tabela 2. 2. Comparação das médias das porcentagens de colágeno tipo I por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD(1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD(2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD(3C); Grupo 1 BAK Tratado OS(1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS(2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS(3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. .... 52

Tabela 2. 3. Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da porcentagem de colágeno tipo III por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles: ..... 52

Tabela 2. 4. Comparação das médias das porcentagens de colágeno tipo III por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK +

ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.  
..... 53

Tabela 2. 5. Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de vasos sanguíneos reativos marcados por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles: ..... 54

Tabela 2. 6. Comparação do número de vasos sanguíneos reativos marcados por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.  
..... 55

Tabela 2. 7. Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de linfócitos reativos marcados por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles: ..... 56

Tabela 2. 8. Comparação do número linfócitos reativos marcados por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS(2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos..... 57

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BAK** - Benzalkonium chloridre, termo em inglês para cloreto de benzalcônio.  
**CD45RO** - Subunidade heterogênea intracelular CD45 de linfócitos.  
**CEUA** - Comitê de ética no Uso de Animais  
**COX-2** - Ciclo-Oxigenase-2  
**VEGF** - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular  
**HE** - Hematoxilina & eosina.  
**IL-2** - Interleucina 2  
**IL4** - interleucina 4  
**IL-6** - Interleucina-6  
**INF-g** - Interferon Gamma  
**LABOCO** - Laboratório de Oftalmologia Comparada  
**MMP** - metaloproteinases  
**MMP-1** - metaloproteinases de matriz – 1  
**NFAT** - Fator Nuclear de Células T Ativadas  
**OD** - Olho direito.  
**OS** - Olho esquerdo.  
**OMS** - Organização Mundial da Saúde  
**PAS** - Ácido periódico de Schiff.  
**PIO** - Pressão intraocular.  
**PUCPR** - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
**TMA** - Tissue microarray - arranjo em matriz de amostras teciduais.  
**UFPR** - Universidade Federal do Paraná.  
**VCAM-1** - Vascular Cellular Adesion Molecule.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO – 1: EFEITOS DO USO TÓPICO DO CONSERVANTE CLORETO DE BENZALCÔNIO E CICLOSPORINA NA CONJUNTIVA DE COELHOS - ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO.....	15
1.1 RESUMO .....	15
1.2 ABSTRACT .....	16
1.3 INTRODUÇÃO .....	17
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1.5 RESULTADOS.....	22
1.6 DISCUSSÃO.....	27
1.7. REFERÊNCIAS.....	34
2. CAPÍTULO 2 - EFEITOS DO USO TÓPICO DO CONSERVANTE CLORETO DE BENZALCÔNIO E CICLOSPORINA NA CONJUNTIVA DE COELHOS – ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	38
2.1 RESUMO .....	38
2.2 ABSTRACT .....	40
2.3 INTRODUÇÃO .....	42
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.5 RESULTADOS.....	50
2.6 DISCUSSÃO.....	57
2.7 REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS E APÊNDICES .....	72
3.1 – Aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais – CEUA - PUCPR.....	72
3.2 – VITA.....	73
REFERENCIAS GERAIS.....	74

# CAPÍTULO – 1: EFEITOS DO USO TÓPICO DO CONSERVANTE CLORETO DE BENZALCÔNIO E CICLOSPORINA NA CONJUNTIVA DE COELHOS - ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO.

## 1.1 RESUMO

**Objetivos:** O estudo comparou os efeitos tóxicos do conservante cloreto de benzalcônio (BAK) tópico na concentração de 0,1% sobre as células caliciformes e formação de neovasos na conjuntiva de coelhos e o possível efeito protetor da ciclosporina 0,05% nessa toxicidade.

**Material e métodos:** Quinze fêmeas clinicamente saudáveis de coelhos da raça Nova Zelândia, de cinco meses de idade e com pesos semelhantes, foram separadas em três grupos de cinco animais cada e tratadas durante 30 dias consecutivos com diferentes protocolos: Grupo 1 - BAK 0,1% a cada 24 horas; Grupo 2 - ciclosporina 0,05% a cada seis horas; e Grupo 3 - BAK 0,1% a cada 24 horas e ciclosporina 0,05% a cada seis horas. Todos os olhos esquerdos foram tratados enquanto os olhos direitos serviram como controle. Após 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os bulbos oculares e anexos foram removidos para o estudo histomorfométrico. Realizou-se a contagem de células caliciformes da conjuntiva em lâminas coradas com PAS e a contagem de vasos sanguíneos em lâminas coradas com HE.

**Resultados:** Na análise histomorfométrica, houve redução significativa ( $P \leq 0,05$ ) do número de células caliciformes nos grupos tratados com BAK e BAK + ciclosporina em comparação com seus respectivos grupos controle. Em associação com o BAK (Grupo 3), a ciclosporina não apresentou efeito protetor e houve redução importante do número de células caliciformes. Com relação aos vasos sanguíneos, houve aumento significativo do número de vasos nos olhos do grupo tratado com BAK (Grupo 1) em comparação com os olhos controles do mesmo grupo, indicando neovascularização e inflamação nos olhos que receberam a droga. Houve diminuição do número de vasos no Grupo 3 (ciclosporina + BAK) em comparação ao grupo tratado somente com o BAK.

**Conclusão:** A ciclosporina apresentou ação relevante na diminuição do número de neovasos quando associada ao BAK em comparação ao grupo tratado somente com o BAK. Este efeito protetor não foi o mesmo em relação às células caliciformes.

**Palavras-chave:** BAK, ciclosporina, células caliciformes, vasos sanguíneos, conjuntiva.

## 1.2 ABSTRACT

**Objective:** The study compared the toxic effects on goblet cells and neovascularization formation in the rabbit conjunctiva induced by topic preservative benzalkonium chloride (BAK) in the concentration of 0.1% and the possible protective effect of cyclosporine 0.05% on this toxicity.

**Procedures:** Fifteen clinically healthy, five-month-old New Zealand white female rabbits with similar weights were divided into three groups of five animals each and treated for 30 consecutive days with different treatment protocols: Group 1 - BAK 0.1% every 12 hours; Group 2 - cyclosporine 0.05% every six hours; and Group 3 - BAK 0.1% every 12 hours and cyclosporine 0.05% every six hours. The left eyes were treated while the right eyes served as controls. After thirty days of treatment, the animals were euthanized and globes were removed and subjected to standard histology processing. Conjunctival goblet cell count was performed in slides stained with PAS and blood vessels count was performed in slides stained with HE.

**Results:** There was a significant reduction ( $P \leq 0.05$ ) in the number of goblet cells in the groups treated with BAK and BAK + cyclosporine compared to their respective control groups. In association with the BAK (Group 3), cyclosporine showed no protective effect and there still was a significant reduction in the number of goblet cells in the conjunctiva. There was a significant increase in the number of vessels in the eyes of the group treated with BAK as compared to the control eyes of the same group demonstrating neovascularization and inflammation in the eyes that received the drug. There was a decrease in the number of blood vessels in Group 3 (cyclosporine + BAK) compared to the group treated with BAK alone.

**Conclusion:** Cyclosporine presented significant action in reducing the number of new vessels when associated with BAK compared to the group treated only with the BAK. This protective effect was not the same in relation to goblet cells.

**Key-words:** BAK, cyclosporine, goblet cells, blood vessels, conjunctiva

### 1.3 INTRODUÇÃO

O glaucoma é uma neuropatia óptica progressiva multifatorial, com mudanças estruturais características no disco óptico, frequentemente acompanhada por mudanças no campo visual, que requer tratamento por longo prazo com substâncias tópicas hipotensoras.<sup>1,2</sup> Existem várias classes de fármacos disponíveis para o tratamento desta doença, incluindo agentes colinérgicos,  $\beta$ -bloqueadores, agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, inibidores da anidrase carbônica e, mais recentemente, os análogos de prostaglandinas.<sup>3</sup>

O tratamento do glaucoma está relacionado ao controle da pressão intraocular (PIO), principalmente por meio de colírios tópicos instilados na superfície ocular. A maioria dos colírios apresenta conservantes em suas composições, responsáveis em manter a esterilidade da solução contra bactérias e fungos oportunistas, aumentando também a penetração da droga e potencializando seu efeito. Alguns conservantes, no entanto, são tóxicos para a conjuntiva, especialmente em casos de uso contínuo do medicamento, como ocorre no tratamento do glaucoma.

O conservante mais utilizado em colírios é o cloreto de benzalcônio (BAK), um amônio quaternário usado como detergente, antisséptico, desinfetante, fungicida e bactericida. O BAK atua, ainda, aumentando a capacidade de penetração corneana de algumas drogas. O seu uso crônico na superfície ocular pode ter impacto significativo, causando disfunção do filme lacrimal e consequente disfunção da superfície ocular por meio de sua ação pró-apoptótica e pró-inflamatória.<sup>4,5</sup> Tais efeitos colaterais implicam em olho vermelho e secreção ocular, surgindo, também, a questão estética nas pessoas dependentes do tratamento, o

que pode trazer incômodo e certo constrangimento. Alternativas que visem diminuir esses efeitos auxiliam, inclusive, no bem-estar e autoestima do paciente.

A ciclosporina tem sido estudada desde a década de 80 na oftalmologia e é comprovadamente eficaz no tratamento da ceratoconjuntivite seca auto-imune, o qual foi descoberto pelo médico veterinário Renee Kaswan em 1989. A ciclosporina é um fármaco imunomodulador que possui propriedades antimetabólicas, sendo capaz de controlar a proliferação celular *in vitro* e, há alguns anos, passou a ser estudada *in vivo*.<sup>6</sup> Assim, a associação da ciclosporina ao tratamento com colírios que contêm o conservante BAK permitirá avaliar se existe redução dos efeitos tóxicos induzidos pelo BAK e redução da atividade inflamatória na conjuntiva.

Uma vez que o tratamento do glaucoma é realizado pelo uso de múltiplos colírios, sendo a sua maioria com conservantes, estudos que avaliem as alterações na conjuntiva são de extrema importância na oftalmologia, tanto para avaliar a eficácia dos protocolos, como para a utilização benéfica e segura para o paciente.

Assim, este trabalho objetiva comparar diferentes protocolos com BAK a uma concentração de 0,1% (aproximadamente 13 vezes maior que o comum encontrado em colírios) e ciclosporina 0,05% (Restasis® - Allergan, Irvine, Califórnia, EUA), mimetizando um uso crônico em 30 dias de experimento e avaliando a reação inflamatória por meio das alterações histológicas nas conjuntivas de coelhos nos diferentes grupos, investigando, assim, o padrão inflamatório em cada protocolo utilizado por meio de estudo histomorfométrico.

## 1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Quinze fêmeas de coelhos saudáveis da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com idades e pesos similares (cinco meses e aproximadamente três quilos, respectivamente) foram divididas aleatoriamente em três grupos diferentes de cinco animais cada. Durante o período de 30 dias consecutivos os grupos foram tratados com diferentes protocolos terapêuticos, a fim de mimetizar o uso crônico dos fármacos:

- Grupo 1: BAK 0,1%, a cada 24 horas.
- Grupo 2: Ciclosporina 0,05% (Restasis®), a cada seis horas.
- Grupo 3: BAK 0,1%, a cada 24 horas e ciclosporina 0,05% (Restasis®), a cada seis horas.

Para todos os grupos, uma gota de cada colírio foi instilada no olho esquerdo de todos os animais, conforme protocolo acima mencionado enquanto o olho direito serviu como controle.

Decorridos os trinta dias do experimento, os animais foram eutanasiados e seus bulbos oculares e pálpebras foram removidos e imediatamente fixados em solução de formol tamponada 10% por 24 horas. Após a fixação em formol, os olhos e pálpebras foram seccionados longitudinalmente (Figura 1.1) e submetidos ao processamento histotécnico padrão com coloração em HE (Hematoxilina-Eosina)<sup>7</sup> e PAS (Ácido Periódico-Schiff).

Para o estudo histomorfométrico, 60 lâminas foram preparadas, sendo 30 (15 olhos esquerdos e 15 olhos direitos) coradas com HE para a contagem dos vasos sanguíneos e 30 com PAS para a contagem das células caliciformes, ou seja, para cada coelho foram confeccionadas quatro lâminas: duas coradas com HE (olho esquerdo e olho direito) e duas coradas com PAS. As amostras histológicas dos

bulbos oculares (Figura 1.2) foram então analisadas por meio de microscopia óptica com o objetivo de avaliar e comparar as alterações nas conjuntivas tanto dos olhos tratados quanto dos olhos controles. Realizou-se a contagem de células calciformes e vasos sanguíneos nas conjuntivas palpebrais inferiores e superiores. Seis campos foram estabelecidos no aumento de 400x em cada pálpebra (inferior e superior), partindo da conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival em direção à conjuntiva palpebral, ou seja, 12 campos por olho.



**Figura 1.1.** Exemplo representativo de um bulbo ocular após enucleação e corte sagital, com seus anexos após a fixação em formaldeído e posterior corte longitudinal.



**Figura 1.2.** Lâmina com uma amostra de bulbo ocular corada em HE. Observe que toda a conjuntiva bulbar e conjuntiva palpebral foi incluída no corte longitudinal para serem analisadas.

#### Local:

A fase experimental do estudo ocorreu no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (UFPR), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias. A análise histomorfométrica também ocorreu no Laboratório de Oftalmologia Comparada (LABOCO), também no Hospital Veterinário da UFPR.

#### Análise estatística:

Após tabulação dos resultados em planilha eletrônica, as diferenças entre os grupos foram comparadas empregando-se o teste de ANOVA para investigar diferenças entre variáveis contínuas numéricas de distribuição normal. As comparações entre o mesmo grupo (olho direito e olho esquerdo) foram realizadas

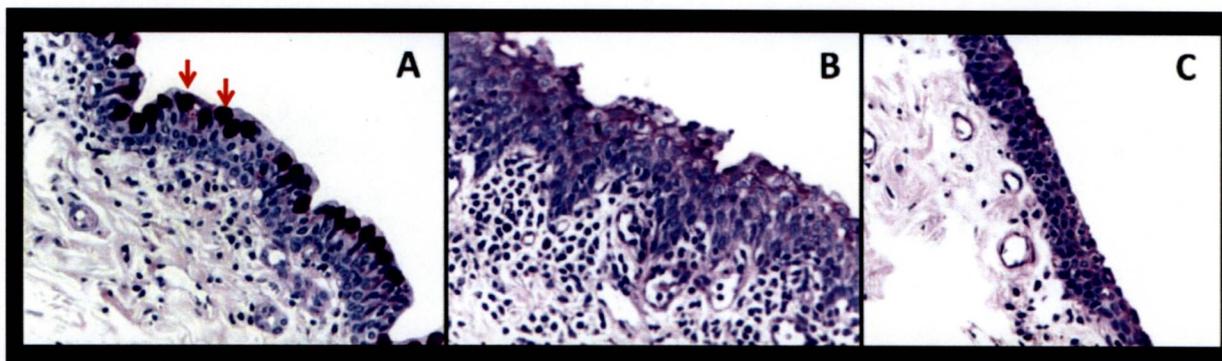
com teste -T pareado, enquanto as comparações de todos os grupos contra todos os grupos foram realizadas com ANOVA de medidas repetidas com pós-teste de Tukey. Valores de P menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

## 1.5 RESULTADOS

Após 30 dias de tratamento, os grupos tratados com BAK e BAK + ciclosporina apresentavam sinais nítidos de inflamação nos olhos esquerdos, com intensidades variadas de secreção ocular, hiperemia conjuntival, quemose e neovascularização corneana.

### *Células Caliciformes*

Na análise das lâminas coradas com PAS para a contagem de células caliciformes, os resultados mostraram que os olhos esquerdos do grupo tratado com BAK apresentaram menor média do número de células caliciformes por campo, enquanto que os olhos tratados somente com ciclosporina apresentaram maior média do número dessas células (Figura 1.3) (Tabela 1.1). Porém, não houve diferença significativa no número de células caliciformes nos olhos tratados apenas com BAK em comparação aos olhos tratados com BAK + ciclosporina (Figura 1.4) (Tabela 1.2).

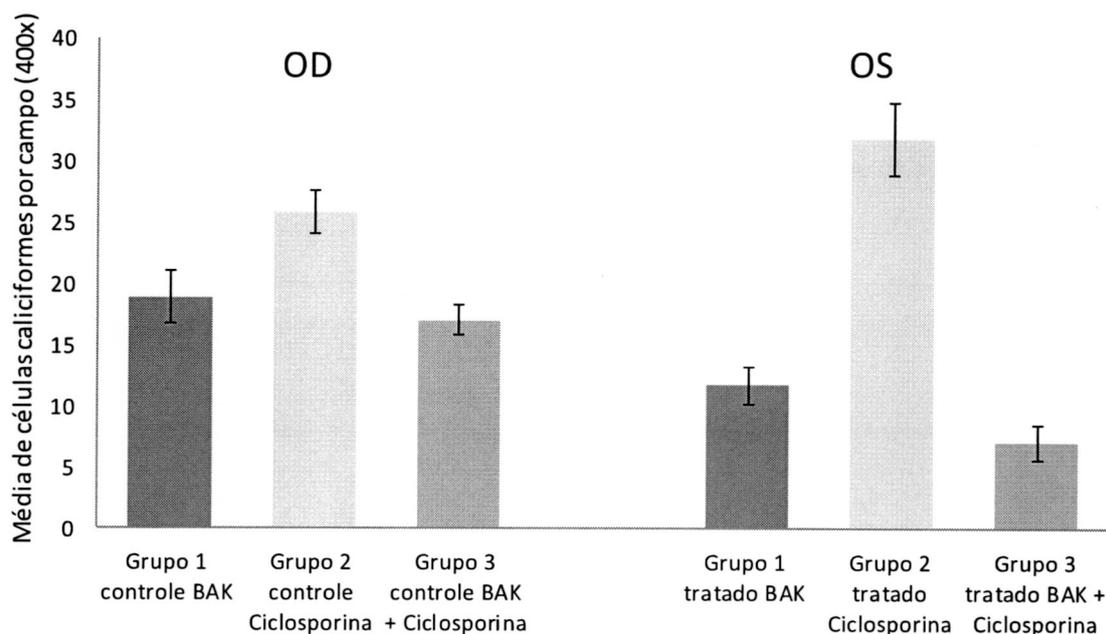


**Figura 1.3.** Fotomicrografias (400x) representativas dos tecidos conjuntivais de coelhos após 30 dias de tratamento, coradas com PAS para destacar as células caliciformes as quais estão indicadas pelas setas vermelhas. A Foto "A" refere-se a um olho do Grupo 2, tratado apenas com ciclosporina 0,05%; A foto "B" refere-se a um olho do Grupo 1, tratado com BAK 0,1%; e a foto "C" refere-se a um olho do Grupo 3, tratado com ciclosporina + 0,1% BAK 0,05%. Observe a escassez de células caliciformes após o tratamento com BAK, tanto nas fotos B como C. Na foto B ainda é possível observar metaplasia do epitélio conjuntival e infiltrado inflamatório subjacente devido à ação do BAK. Todas as amostras de tecido conjuntival foram retiradas do mesmo local (conjuntiva palpebral).

**Tabela 1.1.** Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de células caliciformes por campo (400x) em cada grupo e seus respectivos controles:

	Grupo 1(BAK)	Grupo 2 (ciclosporina)	Grupo 3 (BAK +ciclosporina)
OD (controle)	18,96 $\pm$ 16,17 $\pm$ 2,20	25,88 $\pm$ 13,59 $\pm$ 1,75	17,13 $\pm$ 9,64 $\pm$ 1,24
OS (tratado)	11,81 $\pm$ 12,07 $\pm$ 1,55	32,03 $\pm$ 21,41 $\pm$ 2,91	7,14 $\pm$ 10,21 $\pm$ 1,39

BAK = cloreto de benzalcônio; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo.



Identificação dos grupos experimentais e dos olhos tratados OS e controles OD

**Figura 1.4.** Gráfico evidenciando as médias da contagem de células caliciformes por campo (400x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS). Nota-se a proximidade das médias dos grupos 1(BAK) e 3(BAK + ciclosporina), tanto nos olhos controles quanto nos olhos tratados, sugerindo pouca influência da ciclosporina na proteção das células caliciformes.

Todos os grupos (tratados e controles) foram comparados estatisticamente entre si. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Os principais resultados estão demonstrados na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2.** Comparação das médias da contagem de células caliciformes por campo (400x) entre seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Grupo (média ± Desvio padrão) X Grupo (média ± Desvio padrão)	Valor de p	S
1C (18,96 ± 16,17) x 1T (11,81 ± 12,07)	0,0081	S
1C (18,96 ± 16,17) x 2C (25,88 ± 13,59)	0,0103	S
1T (11,81 ± 12,07) x 3T (7,14 ± 10,21)	0,0827	-
1T (11,81 ± 12,07) x 2T (32,03 ± 21,41)	< 0,001	S
3C (17,13 ± 9,64) x 3T (7,14 ± 10,21)	0,0002	S
3C (17,13 ± 9,64) x 2C (25,88 ± 13,59)	0,0009	S
3T (7,14 ± 10,21) x 2T (32,03 ± 21,41)	< 0,001	S
2C (25,88 ± 13,59) x 2T (32,03 ± 21,41)	0,0224	S

BAK = cloreto de benzalcônio; ciclosp. = ciclosporina 0,05%; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo; S = Significante.

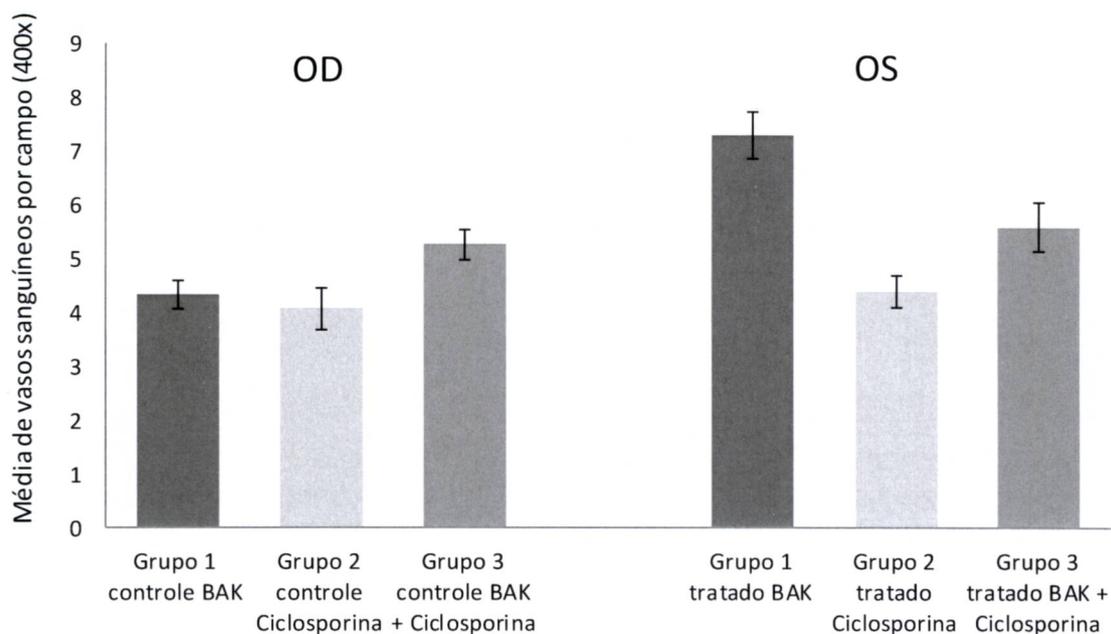
### Vasos sanguíneos

Os olhos tratados com BAK (Grupo 1) apresentaram maior número de vasos sanguíneos por campo (Tabela 1.3), enquanto que os olhos tratados somente com ciclosporina (Grupo 2) e olhos tratados com BAK + ciclosporina (Grupo 3) apresentaram diferença significativamente menor do número de vasos sanguíneos por campo quando comparados ao Grupo 1 (Figura 1.5) (Tabela 1.4). Em contrapartida, o Grupo 3 (BAK + ciclosporina), ao ser comparado com o Grupo 2 (ciclosporina), também apresentou número significativamente maior de vasos. Tais resultados confirmaram o que se observou clinicamente em cada grupo antes da eutanásia. A hiperemia conjuntival nos olhos tratados era mais evidente no Grupo 1 em relação ao Grupo 2 e 3 e, por sua vez, mais evidente no Grupo 3 em relação ao Grupo 2 (Figura 1.6).

**Tabela 1.3.** Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de vasos sanguíneos por campo (400x) em cada grupo e seus respectivos controles:

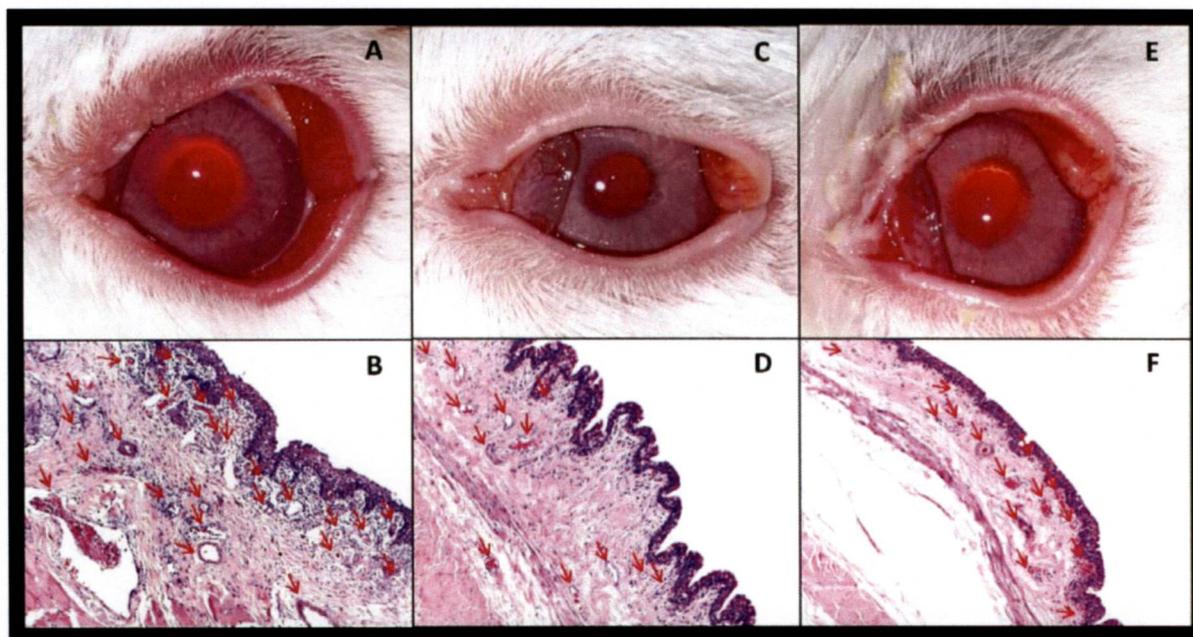
	Grupo 1 (BAK)	Grupo 2 (ciclosporina)	Grupo 3 (BAK + ciclosporina)
OD (controle)	4,33 $\pm$ 1,96 $\pm$ 0,26	4,06 $\pm$ 3,03 $\pm$ 0,39	5,26 $\pm$ 2,12 $\pm$ 0,27
OS (tratado)	7,31 $\pm$ 3,41 $\pm$ 0,44	4,38 $\pm$ 2,22 $\pm$ 0,30	5,59 $\pm$ 3,35 $\pm$ 0,45

BAK = cloreto de benzalcônio; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo.



Identificação dos grupos experimentais e dos olhos tratados OS e controles OD

**Figura 1.5.** Médias do número de vasos sanguíneos por campo (400x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS). Nota-se redução significativa da média do Grupo 2 e 3 em relação ao Grupo 1 nos olhos tratados.



**Figura 1.6.** Comparação clínica e histológica entre os olhos esquerdos de cada grupo após 30 dias de tratamento com fotomicrografias representativas demonstrando a contagem de vasos sanguíneos por campo (100x) em cortes corados com HE. "A" e "B" correspondem ao Grupo 1 (BAK), "C" e "D" correspondem ao Grupo 2 (ciclosporina) e "E" e "F" correspondem ao Grupo 3 (BAK + ciclosporina).

Todos os grupos (tratados e controles) foram comparados estatisticamente entre si. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Os principais resultados estão apresentados na Tabela 1.4.

**Tabela 1.4.** Comparação das médias da contagem de vasos sanguíneos entre seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Grupo (média $\pm$ Desvio padrão) X Grupo (média $\pm$ Desvio padrão)	Valor de p	S
1C (4,33 $\pm$ 1,96) x 1T (7,31 $\pm$ 3,41)	<0,0001	S
1C(4.33 $\pm$ 1.96) x 3T (5.59 $\pm$ 3.35)	0.0183	S
1T (7,31 $\pm$ 3,41) x 3T (5,59 $\pm$ 3,35)	0,0010	S
1T (7,31 $\pm$ 3,41) x 2T (4,38 $\pm$ 2,22)	< 0,0001	S
3C (5,26 $\pm$ 2,12) x 2C (4,06 $\pm$ 3,03)	0.0178	S
3C (5,26 $\pm$ 2,12) x 3T (5,59 $\pm$ 3,35)	0,5293	-
3T (5,59 $\pm$ 3,35) x 2C (4,06 $\pm$ 3,03)	0.0034	S
3T (5,59 $\pm$ 3,35) x 2T(4,38 $\pm$ 2,22)	0,0240	S
2C (4,06 $\pm$ 3,03) x 2T(4,38 $\pm$ 2,22)	0,5340	-

BAK = cloreto de benzalcônio; ciclosp.= ciclosporina 0,05% OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo; S = Significante.

## 1.6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, este estudo confirmou as evidências já estudadas de que muitos fármacos utilizados para o tratamento do glaucoma administrados topicamente afetam a estrutura e a integridade da superfície ocular.<sup>8,9,10</sup> Os efeitos colaterais de tais medicações incluem hiperemia conjuntival, sensação de corpo estranho e sintomas de doença do olho seco, causados não só pelas substâncias ativas dos fármacos, mas, talvez mais importante, também pelos agentes conservantes e excipientes presentes em sua composição, como o cloreto de benzalcônio.<sup>5,11</sup> Todas essas alterações foram observadas no decorrer da fase experimental do estudo.

A análise histomorfométrica mostrou que a terapia tópica empregada simulou efetivamente o uso crônico do conservante BAK, uma vez que foi capaz de induzir

rapidamente alterações morfológicas graves na superfície ocular de coelhos saudáveis, observadas apenas com seu uso crônico.

A concentração de 0,1% do BAK foi determinada baseada em trabalhos que utilizaram em experimentações *in vitro* concentrações maiores que as utilizadas comercialmente em colírios (0,005% a 0,02%), porém menores que 0,1% (variando de 0,06 a 0,09%)<sup>12,13,14</sup> e, também, em estudos que utilizaram uma concentração ainda maior (0,2%) em coelhos.<sup>15</sup> Por se tratar de um estudo *in vivo* que objetiva mimetizar o uso crônico de colírios com o conservante em apenas 30 dias, optou-se, por uma concentração maior que as utilizadas em estudos *in vitro*. Vale enfatizar que a tentativa de simular o uso crônico com uma maior concentração de BAK por um período curto não necessariamente é a mesma situação que o uso prolongado com concentrações menores. Porém, a dificuldade de realizar estudos *in vivo* por períodos prolongados, para avaliar a real alteração que o conservante em concentrações normais pode causar na conjuntiva, implica na realização de simulações em períodos menores e concentrações maiores como uma alternativa de estudar tais efeitos colaterais em longo prazo.

A ciclosporina 0,05% (Restasis®), droga de escolha para este estudo a qual foi aprovada pela United States Food and Drug Administration (FDA) para aumentar a produção lacrimal em pacientes cuja produção é suprimida devido à inflamação ocular associada à ceratoconjuntivite seca, demonstrou atenuar algumas dessas alterações. A mesma é um agente imunossupressor potente que inibe a proliferação e a ação de linfócitos T por meio de bloqueio da síntese de citocinas e tem sido utilizada para o tratamento de doenças da superfície ocular, incluindo uveíte, rejeição de transplante de córnea e ceratoconjuntivite seca.<sup>16,17,18</sup>

Diversos trabalhos clínicos expuseram a eficácia e a segurança do tratamento em longo prazo com Restasis® em pacientes com moderada a severa doença do olho seco, com melhora dos sintomas e controle eficaz da inflamação,<sup>19,20</sup> corroborando com o que foi observado clinicamente e histologicamente nos grupos que receberam o tratamento com o fármaco neste estudo, principalmente no que se diz respeito à hiperemia conjuntival e neovascularização.

A ação do tratamento no Grupo 1 com BAK 0,1% na conjuntiva de coelhos causou diminuição significativa no número de células calciformes quando comparado aos olhos controles do mesmo grupo e aos olhos tratados do Grupo 2 (ciclosporina 0,5%). Esse efeito deletério do BAK na superfície ocular já foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* em animais e em seres humanos e o seu uso pode ter impacto significativo, principalmente em longo prazo, podendo causar dissolução conservadora do filme lacrimal. O BAK possui, também, efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios na superfície ocular e induz à metaplasia escamosa do epitélio conjuntival, além da diminuição no número de células calciformes.<sup>21,22,23,24</sup>

Mesmo nos olhos tratados do Grupo 3 (BAK + ciclosporina) houve redução significativa do número de células calciformes por campo em comparação aos olhos tratados somente com ciclosporina (Grupo 2) e seus olhos controles (Grupo 3). Já comparando o Grupo 3 com o Grupo 1 (BAK + Ciclosporina x BAK), não houve diferença significativa no número dessas células. Isso significa que, apesar da ciclosporina ter efeitos anti-inflamatórios comprovados cientificamente, sua ação sobre a preservação das células calciformes frente ao BAK não foi considerável nesse estudo, supondo-se que a ciclosporina não tem efeito contra a citotoxicidade do BAK, não impedindo a lise a apoptose celular, uma vez que a ação do BAK tem

se demonstrado bastante deletéria em concentrações ainda menores que a utilizada nesse estudo. Já foi comprovado que uma concentração de 0,007 % de BAK induz lise de 50% de células epiteliais em cultura, em menos de 2 minutos, e que o uso prolongado de medicação ocular tópica conservada com BAK pode exacerbar os sinais e sintomas de doenças da superfície ocular e tem efeitos adversos graves na córnea e conjuntiva.<sup>25,26</sup> Estes efeitos incluem a indução de inflamação subclínica, a redução da função de barreira epitelial corneana, a desestabilização do filme lacrimal e à incidência de sensação de secura e irritação nestes pacientes.<sup>27</sup> O BAK exerce a sua ação por meio de um mecanismo citotóxico direto, acentuado pelo efeito cumulativo de administrações repetidas de colírios com conservantes (efeito dose-dependente).

Neste estudo os efeitos dos tratamentos apresentaram resultados interessantes em alguns grupos controles. Houve diferença significativa do número de células caliciformes nos olhos controles dos grupos que foram tratados com BAK (Grupo 1 e 3) nos olhos contralaterais comparados com os olhos controle do Grupo 2, que receberam apenas a ciclosporina no olho contralateral. Em frente a este fato, sugere-se que uma possível absorção sistêmica mínima dos tratamentos pode ter influenciado tal resultado também nos olhos que não receberam tratamento algum. A absorção sistêmica de colírios é um fato bastante descrito na literatura. Medicamentos administrados por via tópica caem diretamente na circulação sistêmica principalmente pelo canal nasolacrimal e posterior absorção pela mucosa nasal, a via mais rápida de absorção quando comparada à via conjuntival e corneana. As concentrações absorvidas pela conjuntiva e córnea, que por sua vez serão absorvidas pelo humor aquoso, caindo na circulação por meio de sua drenagem, são mínimas se comparadas às concentrações absorvidas diretamente

pela mucosa nasal. Há relatos de possível absorção sistêmica causando até mesmo insuficiência respiratória secundária à instilação de colírios antiglaucomatos à base de  $\beta$ -antagonistas, uma vez que o fármaco é absorvido ainda mais rapidamente pelo mucosa nasal.<sup>28,29</sup>

Com relação à análise do número de vasos sanguíneos em cada grupo, houve aumento significativo nos olhos tratados do Grupo 1 (que recebeu o tratamento somente com o BAK) quando comparados ao seu grupo controle e a todos os demais grupos. Tal observação também comprova a ação inflamatória do BAK e consequente estímulo da formação de neovasos, pois tal conservante tem um efeito detergente na camada lipídica do filme lacrimal, causando irritação, inflamação e neovascularização. Estudos revelam que pacientes que recebem um maior número de gotas de colírios com conservantes durante um tempo mais longo apresentaram sintomas mais severos de doença da superfície ocular.<sup>30,31,32,33,34</sup>

Os olhos tratados do Grupo 3 (BAK + Ciclosporina) quando comparados aos olhos controles do Grupos 1 e 2 ou aos olhos tratados somente com ciclosporina do Grupo 2, apresentaram aumento significativo do número de vasos. Porém, quando comparados aos olhos tratados do Grupo 1 (BAK), apresentaram redução significativa desse número, o que comprova que a ciclosporina tem ação eficaz contra a formação de neovasos, por mais que não os tenha reduzido no Grupo 3 (BAK + Ciclosporina) a ponto de não haver diferença quando comparado aos grupos controles e aos olhos tratados do grupo que recebeu apenas a ciclosporina. Ou seja, a eficácia da ciclosporina só pôde ser observada na comparação dos grupos que receberam BAK (BAK x BAK+ ciclosporina).

O Grupo 3 controle (BAK + Ciclosporina), quando comparado ao Grupo 2 controle, cujos olhos contralaterais receberam apenas ciclosporina, apresentou

aumento significativo do número de neovasos. Tal fato sugere novamente que possa haver absorção sistêmica dos fármacos, os quais também influenciaram no processo inflamatório das conjuntivas que não receberam tratamento algum.

Não houve diferença estatística entre os olhos do Grupo 2 tratados somente com ciclosporina em relação aos demais grupos controles, sugerindo que a ciclosporina não reduz o número de vasos pré-existentes, apenas os neovasos de origem inflamatória.

Além deste estudo no qual identificou-se, por meio da redução da neovascularização, a ação benéfica da ciclosporina na reação inflamatória, a resposta positiva ao tratamento com ciclosporina A foi identificada em um modelo inflamatório *in vitro* com células epiteliais da córnea na ceratocone. Tal estudo observou que as citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), metaloproteinase de matriz-9 e factor de necrose tumoral- $\alpha$  reduziram significativamente após o tratamento com ciclosporina A. Esse efeito foi observado em curto prazo tratando-se de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-  $\alpha$  e em longo prazo tratando-se de metaloproteinase de matriz-9, podendo, inclusive, interromper a progressão da doença.<sup>35</sup>

A redução do número de instilações de colírios com conservantes é uma maneira plausível de se diminuir as complicações geradas pelos mesmos, sendo a utilização de colírios sem conservantes a opção ideal sempre que possível. Apresentando uma outra alternativa, este estudo demonstrou que o uso da ciclosporina pode amenizar os efeitos colaterais causados pelos conservantes. A ciclosporina apresentou ação relevante na diminuição do número de neovasos quando associada ao BAK em comparação ao grupo tratado somente com o BAK. Este efeito protetor não foi o mesmo em relação às células calciformes. Sugere-se

a associação da ciclosporina a outros protocolos anti-inflamatórios para controle das demais alterações da superfície ocular no uso crônico de colírios com o conservante.

## 1.7. REFERÊNCIAS

1. Gordon, M.O., Beiser, J.A., Brandt, *et al.* The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 2002, v. 120, n. 6, p. 714-20.
2. Weinreb, R. N; Medeiros, F. A. Como definir o glaucoma? In: SUSANNA JUNIOR, R.; WEINREB, R. N. *Glaucoma: Perguntas e Respostas*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005, p.1-7.
3. Ritch, R.; Shields, B.; Krupin, T. Pharmacology. In: Ritch, R., Shields, M.B., Krupin, T. *The glaucomas*. 2ª ed. St. Louis: Mosby, 1996, vol.3, p.1375-1489.
4. Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A, Zeyen T. Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *European Journal of Ophthalmology*, 2007, 17: 341-349.
5. Baudouin, C., Labbé A, Liang H, *et al.* Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2010, v. 29, n. 4, p. 312-334.
6. Turacli, E, Gündüz K., Aktan G., *et al.* A comparative clinical trial of mitomycin C and cyclosporine A in trabeculectomy. *European Journal Ophthalmology*. 1996 Oct-Dec; 6(4):398-401.
7. Faria N.V.L, Russ H.H, Rose P, *et al.* Conjunctival changes and inflammatory aspects in rabbits' conjunctivas induced by fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol maleate. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 2013, 3: 22.
8. Steuhl K.P., Knorr M., Frohn A.,*et al.* Effect of anti-glaucoma eye drops on cell differentiation of the conjunctiva. *Fortschritte der Ophthalmologie*, 1991, 88:865–9.

9. Schwab I.R., Linberg J.V., Gioia V.M., *et al.* Foreshortening of the inferior conjunctival fornix associated with chronic glaucoma medications. *Ophthalmology*, 1992, 99:197–202.
10. Nuzzi R., Vercelli A., Finazzo C., *et al.* Conjunctiva and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Graefes Archive of Clinical and Experimental Ophthalmology*, 1995, 233:154–162.
11. Lockington D., Macdonald E.C., Stewart P., *et al.* Free radicals and the pH of topical glaucoma medications: a lifetime of ocular chemical injury? *Eye (Lond)*, 2012, 26:734–741.
12. Seibold, L.K, Ammar, D.A, Kahook, M.Y. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity in vitro. *Current Eye Research*, 2013, v.38, n.1, p. 70-74.
13. Ammar, D. A, Noecker, R.J, Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Advances in Therapy*, 2010, v.27, n. 11, p. 837-45.
14. Ammar, D. A, Noecker, R.J, Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride- and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells. *Advances in Therapy*, 2011, v. 28, n.6, p. 501-10.
15. 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*, 2012, v. 7, n.11, e:50180.
16. Utine C.A., Stern M., Akpek E.K. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporine A. *Ocular Immunology and Inflammation*, 2010, 18:352-61.

17. Matsuda S., Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 2000, 47:119-25.
18. Belin M.W., Bouchard C.S., Phillips T.M. Update on topical cyclosporine A. Background, immunology, and pharmacology. *Cornea*, 1990, 9:184-95.
19. Wilson S.E., Perry H.D. Long-term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. *Ophthalmology*, 2007, 114:76-9.
20. Chen M., Gong L., Sun X., *et al.* A comparison of cyclosporine 0.05% ophthalmic emulsion versus vehicle in Chinese patients with moderate to severe dry eye disease: an eight-week, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group trial. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2010, 26:361-6.
21. Herreras, J., Pastor J. C, Calonge M., *et al.* Ocular Surface Alteration after Long-term Treatment with an Antiglaucomatous Drug. *Ophthalmology*, 1992, v. 99, n. 7, p. 1082-1088.
22. Turacli E., Budak K., Kaur A., *et al.* The effects of long-term topical glaucoma medication on conjunctival impression cytology. *International Ophthalmology*, 1997, 21:27–33.
23. Arici M.K., Arici D.S., Topalkara A., *et al.* Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2000, 28:113–117.
24. Baudouin C., Hamard P., Liang H., *et al.* Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology*, 2004, 111:2186–2192.
25. Takahashi N. Quantitative cytotoxicity of preservatives evaluated in cell culture with Chang's human conjunctival cells-effect of temperature on cytotoxicity. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 1982, 26:234-238.

26. Zuccotti G.V., Fabiano V. Safety issues with ethanol as an excipient in drugs intended for pediatric use. *Expert Opinion on Drug Safety*, 2011, 10(4): 499-502.
27. Costa M. A.; Reis R. F.; Furtado M. J.; *et al.* Efeitos da Medicação Tópica Antiglaucomatosa na Superfície Ocular. *Oftalmologia*, 2012, v. 36, p. 117-122.
28. Urtti, A., Salminen. Minimizing Systemic Absorption of Topically Administered Ophthalmic Drugs. *Survey of Ophthalmology*, 1993, v.37, n.6. p. 435-56.
29. Diggors, P., Franks, W. A. Glaucoma therapy may take your breath away. *Age and Ageing*, 1997, v.26, p.63-67.
30. Wilson W.S., Duncan A.J., Jay J.L. Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *British Journal of Ophthalmology*, 1975, 59: 667-669.
31. Leung E.W, Medeiros F.A., Weinreb R.N. Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. *Journal of Glaucoma*, 2008, 17:350–355.
32. Fechtner R.D., Godfrey D.G., Budenz D., *et al.* Prevalence of ocular surface complaints in patients with glaucoma using topical intraocular pressure-lowering medications. *Cornea*, 2010, 29:618–621.
33. Skalicky S.E., Goldberg I., McCluskey P. Ocular surface disease and quality of life in patients with glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 2012, 153(1):1–9, e2.
34. Mathews P.M., Ramulu P.Y., Friedman D.S., *et al.* Evaluation of ocular surface disease in patients with glaucoma. *Ophthalmology*, 2013, 120:2241–2248.
35. Shetty, R.; Ghosh, A.; Lim, R.R.; *et al.* Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2015, v. 56, n. 2, p. 738–50.

## 2. CAPÍTULO 2 - EFEITOS DO USO TÓPICO DO CONSERVANTE CLORETO DE BENZALCÔNIO E CICLOSPORINA NA CONJUNTIVA DE COELHOS – ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.

### 2.1 RESUMO

**Objetivo:** O estudo comparou, por meio de análise imuno-histoquímica, os efeitos tóxicos do conservante cloreto de benzalcônio (BAK) 0,1% tópico na conjuntiva de coelhos, avaliando sua ação sobre a fibrose tecidual, inflamação do endotélio vascular e recrutamento de linfócitos T reativos e o possível efeito protetor da ciclosporina 0,05% .

**Material e métodos:** Quinze fêmeas clinicamente saudáveis de coelhos da raça Nova Zelândia, de cinco meses de idade e com pesos semelhantes, foram separadas em três grupos de cinco animais cada e tratadas durante 30 dias consecutivos com diferentes protocolos: Grupo 1 - BAK 0,1% a cada 24 horas; Grupo 2 - ciclosporina 0,05% a cada seis horas; e Grupo 3 – BAK 0,1% a cada 24 horas e ciclosporina 0,05% a cada seis horas. Todos os olhos esquerdos foram tratados enquanto os olhos direitos serviram como controle. Após 30 dias de tratamento, os animais sofreram eutanásia e os bulbos oculares e anexos foram removidos para o estudo imuno-histoquímico. Realizou-se a análise da fibrose tecidual, contagem de vasos sanguíneos reativos e linfócitos T reativos por meio do processamento imuno-histoquímico com os anticorpos anti-colágeno I, anti-colágeno III, anti-VCAM-1 e anti-CD45RO, respectivamente.

**Resultados:** Os olhos do Grupo 3 apresentaram média significativamente menor da porcentagem de colágeno tipo I e maior de colágeno tipo III enquanto que o grupo tratado apenas com o BAK no Grupo 1 apresentaram média significativamente maior de colágeno tipo I e menor expressão de colágeno tipo III. Houve aumento da

expressão de colágeno tipo I nos olhos tratados somente com ciclosporina. Nos olhos tratados somente com BAK houve aumento estatisticamente significativo da expressão do anticorpo anti-VCAM-1 e a associação da ciclosporina ao BAK demonstrou redução significativa dessa expressão. Porém a resposta da conjuntiva ao anticorpo anti-CD45RO foi significativamente maior nos olhos tratados do grupo que recebeu a associação da ciclosporina ao tratamento com o BAK (Grupo 3). Observou-se a ação da ciclosporina na supressão de linfócitos T apenas no grupo que recebeu o tratamento individual com a mesma (Grupo 2), sem o estímulo inflamatório do BAK.

**Conclusão:** A ciclosporina retardou o processo de remodelamento (fibrose) da conjuntiva causado pela inflamação e apresentou ação anti-inflamatória e de supressão da angiogênese induzidas pelo BAK. Não houve inibição da ativação de linfócitos T reativos no Grupo 3. Este estudo demonstrou claramente a ação benéfica da ciclosporina sobre o endotélio vascular e maior expressão de colágeno I e fibrose em olhos não inflamados e tratados pela droga.

**Palavras-chave:** BAK, ciclosporina, fibrose, angiogênese, linfócitos T reativos, glaucoma.

## 2.2 ABSTRACT

**Objective:** The study investigated using immunohistochemical analysis the toxic effects of 0.1% benzalkonium chloride (BAK) on the rabbit conjunctiva and a possible protective effect of cyclosporine 0.05% on this toxicity

**Procedures:** Fifteen clinically healthy, five-month-old New Zealand white female rabbits with similar weights were divided into three groups of five animals each and treated for 30 consecutive days with different protocols: Group 1 - BAK 0.1% every 12 hours; Group 2 - cyclosporine 0.05% every six hours; and Group 3 - BAK 0.1% every 12 hours and cyclosporine 0.05% every six hours. The left eyes were treated while the right eyes served as controls. After 30 days of treatment, the animals were euthanized, and globes were removed and subjected to standard processing for histology and immunohistochemistry. Tissue fibrosis analysis, counting of reactive blood vessels and reactive T lymphocytes were performed by immunohistochemical processing with the anti-collagen I, anti-collagen III, anti-VCAM-1 and anti-CD45RO antibodies, respectively.

**Results:** Conjunctival samples of Group 3 had a significantly lower mean of collagen type I and higher collagen type III, whereas samples from the group treated with BAK only showed a significantly higher mean of collagen type I and lower collagen type III expression. There was an increase in collagen type I expression in the eyes treated with cyclosporine alone. In BAK-treated eyes, there was a significant increase in anti-VCAM-1 antibody expression and the association of cyclosporine with BAK demonstrated a significant reduction in this parameter. However, the conjunctival response to the anti-CD45RO antibody was significantly higher in the eyes treated with cyclosporine + BAK (Group 3). The activity of cyclosporine on T

lymphocyte suppression was observed only in the group that received cyclosporine alone (Group 2) without the inflammatory stimulus of BAK.

**Conclusion:** Cyclosporine delayed the remodeling process (fibrosis) of the conjunctiva caused by inflammation and showed anti-inflammatory activity and suppression of angiogenesis induced by BAK. There was no inhibition of the activation of reactive T lymphocytes in Group 3. This study clearly demonstrated the beneficial action of cyclosporin on vascular endothelium and increased expression of collagen I and fibrosis in non-inflamed, drug-treated eyes.

**Key-words:** BAK, cyclosporine, fibrosis, angiogenesis, reactive T lymphocytes, glaucoma.

## 2.3 INTRODUÇÃO

O uso contínuo de medicações tóxicas, especialmente no tratamento do glaucoma, induz efeitos tóxicos na superfície ocular causados pelos conservantes presentes nas formulações. Em vista disso, a indústria farmacêutica tem buscado novas formulações contendo conservantes menos tóxicos e, ou, ausência de conservantes

Cronicamente, tais efeitos tóxicos acabam sendo deletérios para a saúde ocular assim como psicologicamente para o paciente, pois há disfunção do filme lacrimal e comprometimento da estética ocular, principalmente devido à presença de hiperemia conjuntival, hiperpigmentação periocular e secreção.

O cloreto de benzalcônio (BAK) é o conservante mais frequentemente utilizado nessas drogas e é relatado como especialmente tóxico para a superfície ocular, particularmente para o epitélio da córnea e da conjuntiva, assim como a uma grande variedade de agressores externos, como poluição do ar, alterações climáticas, infecções e alergia.<sup>1</sup> As agressões às células epiteliais da conjuntiva são tipicamente seguidas por uma resposta inflamatória. Este processo estimula uma resposta fibrogênica de cicatrização, que envolve múltiplos sistemas celulares e moleculares. Em nível celular, as células inflamatórias produzem uma variedade de mediadores, citocinas e outros fatores que são responsáveis pela estimulação e recrutamento de outras células, dentre as quais destacam-se as células efectoras fibrogênicas que desencadeiam o processo de fibrose. Estas células são de origem mesenquimal e incluem fibroblastos, fibrócitos e miofibroblastos. Tais células produzem uma variedade de proteínas de matriz extracelular, peptídeos, citocinas e fatores de crescimento, os quais regulam de maneira autócrina as interações

célula-célula.<sup>2</sup> O uso crônico do BAK junto aos colírios pode desencadear a maioria destas alterações, causando lesão dos epitélios da superfície ocular e, conseqüentemente, disfunção do filme lacrimal, por meio de sua ação pró-apoptótica e pró-inflamatória.<sup>3,4</sup> Por outro lado, o BAK é também responsável por manter a esterilidade do fármaco, além de aumentar a penetração da droga, muitas vezes potencializando seu efeito.

Alternativas que visem diminuir esses efeitos, como reduzir ou eliminar a presença do BAK em colírios, criar conservantes alternativos e mesmo ausência de conservantes, auxiliam na manutenção da saúde ocular mantendo a conjuntiva saudável, mas também no que tange o bem-estar e a autoestima dos pacientes.

Dentre as possibilidades de associação com outros fármacos a ciclosporina tem despertado o interesse de pesquisadores, pois tem sido estudada desde os anos 80 na oftalmologia veterinária e médica, sendo comprovadamente eficaz no tratamento da ceratoconjuntivite seca auto-imune. Trata-se de um fármaco imunomodulador que possui propriedades antimetabólicas, sendo capaz de controlar a proliferação celular inflamatória *in vitro* e, há alguns anos, passou a ser estudada *in vivo*.<sup>5</sup> A ciclosporina é classificada como fármaco inibidor da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T, não apresentando caráter citotóxico. Sua ação se dá pela inibição da calcineurina e conseqüente inibição da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e formação do linfócito T citotóxico. Uma dessas proteínas é o fator nuclear de células T ativado (NFAT) que estimula a transcrição dos mesmos e a secreção das referidas citocinas. O bloqueio do NFAT é considerado, portanto, o principal efeito da ciclosporina.<sup>6</sup> Uma possível associação da ciclosporina ao tratamento com o

conservante BAK permitiria avaliar se existe redução dos efeitos tóxicos e da atividade inflamatória na conjuntiva induzidos pelo mesmo.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar diferentes protocolos com BAK a uma alta concentração de 0,1% e ciclosporina 0,05% (Restasis® - Allergan, Irvine, Califórnia, EUA), investigando, assim, o padrão inflamatório em cada protocolo utilizado por meio de estudo imuno-histoquímico.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Quinze fêmeas de coelhos saudáveis da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com idades e pesos similares (cinco meses e aproximadamente três quilos, respectivamente) foram divididas aleatoriamente em três grupos diferentes de cinco animais cada. Durante o período de 30 dias consecutivos os grupos foram tratados com diferentes protocolos.

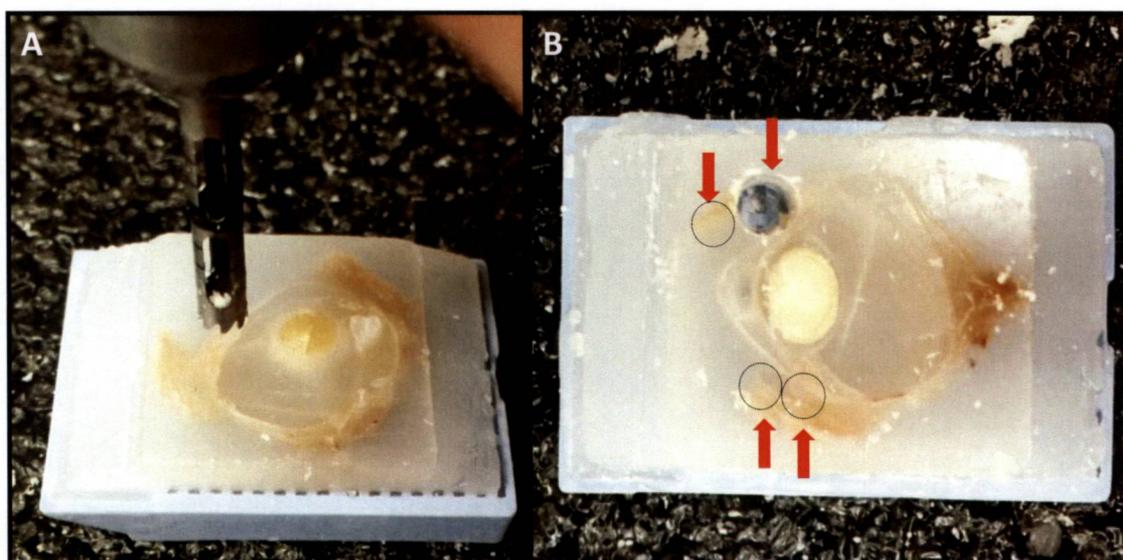
- Grupo 1: BAK 0,1%, a cada 24 horas.
- Grupo 2: Ciclosporina 0,05% (Restasis®), a cada seis horas.
- Grupo 3: BAK 0,1%, a cada 24 horas e ciclosporina 0,05% (Restasis®), a cada seis horas.

Para todos os grupos, uma gota de cada colírio foi instilada no olho esquerdo de todos os animais, conforme protocolo acima mencionado enquanto o olho direito serviu como controle.

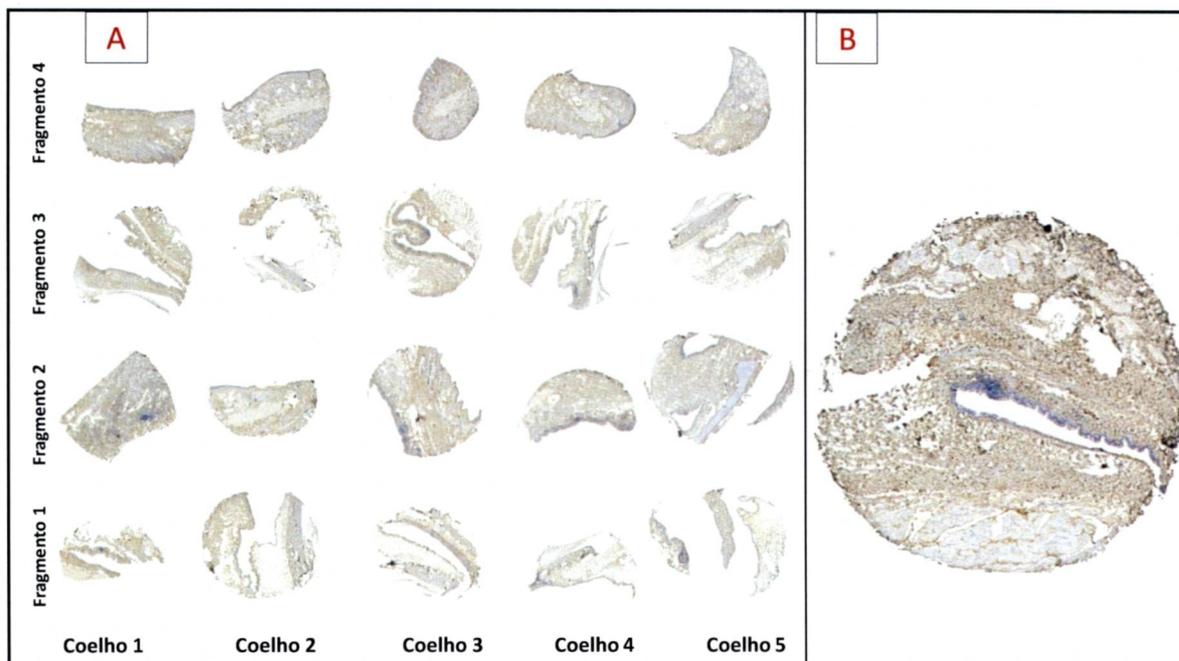
Decorridos os 30 dias do experimento, os animais sofreram eutanásia e seus bulbos oculares e pálpebras foram removidos e imediatamente fixados em solução de formol tamponada 10% por 24 horas. Após a fixação em formol, os olhos e pálpebras foram seccionados longitudinalmente e submetidos ao processamento histotécnico padrão com inclusão em parafina.

Para o estudo imuno-histoquímico, optou-se pela técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais, ou TMA (*Tissue Microarray*). Tal técnica consiste em construir um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras de tecidos obtidos de diversos outros blocos, sendo subsequentemente cortados em cinco  $\mu\text{m}$  de espessura proporcionando padronização da marcação com o anticorpo nas amostras e, inclusive, barateando o custo da pesquisa.<sup>7</sup>

Neste estudo, para cada uma das duas pálpebras (inferior e superior) de cada olho, individualizado inicialmente em um bloco de parafina, foram selecionados dois sítios, um abrangendo a conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival e outro a conjuntiva palpebral, ou seja, quatro fragmentos palpebrais por olho (Figura 2.1). Os mesmos compuseram, em sequência pré-determinada para posterior leitura, os novos blocos para a confecção das lâminas de TMA, que foram divididas em seis grupos, isto é, seis lâminas para cada marcador imuno-histoquímico: três lâminas (Grupo 1, 2 e 3) dos olhos esquerdos tratados e três lâminas dos olhos direitos controles (Figura 2.2).



**Figura 2. 1.** Exemplo representativo de um bloco doador com um dos olhos em corte longitudinal para a confecção das lâminas de TMA. A: Vazador rotatório elétrico utilizado para a coleta dos fragmentos das áreas conjuntivais a serem analisadas. B: Área coletada abrangendo a conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival de uma das pálpebras. As setas vermelhas e círculos pontilhados indicam as quatro regiões a serem coletadas da conjuntiva de coelhos, abrangendo a conjuntiva bulbar, fórnice conjuntival e conjuntiva palpebral de ambas as pálpebras.



**Figura 2.** A: Exemplo de uma lâmina de TMA e a sequência dos fragmentos palpebrais para cada um dos cinco coelhos de cada grupo para a análise do tecido conjuntival. Os fragmentos identificados como “1” e “3” correspondem à conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival de cada pálpebra (superior e inferior), assim como os fragmentos “2” e “4” correspondem à conjuntiva palpebral (magnificação: 2,5x). B: Exemplo de um dos fragmentos abrangendo a conjuntiva bulbar e fórnice conjuntival e substancia própria, em maior aumento (magnificação: 5x).

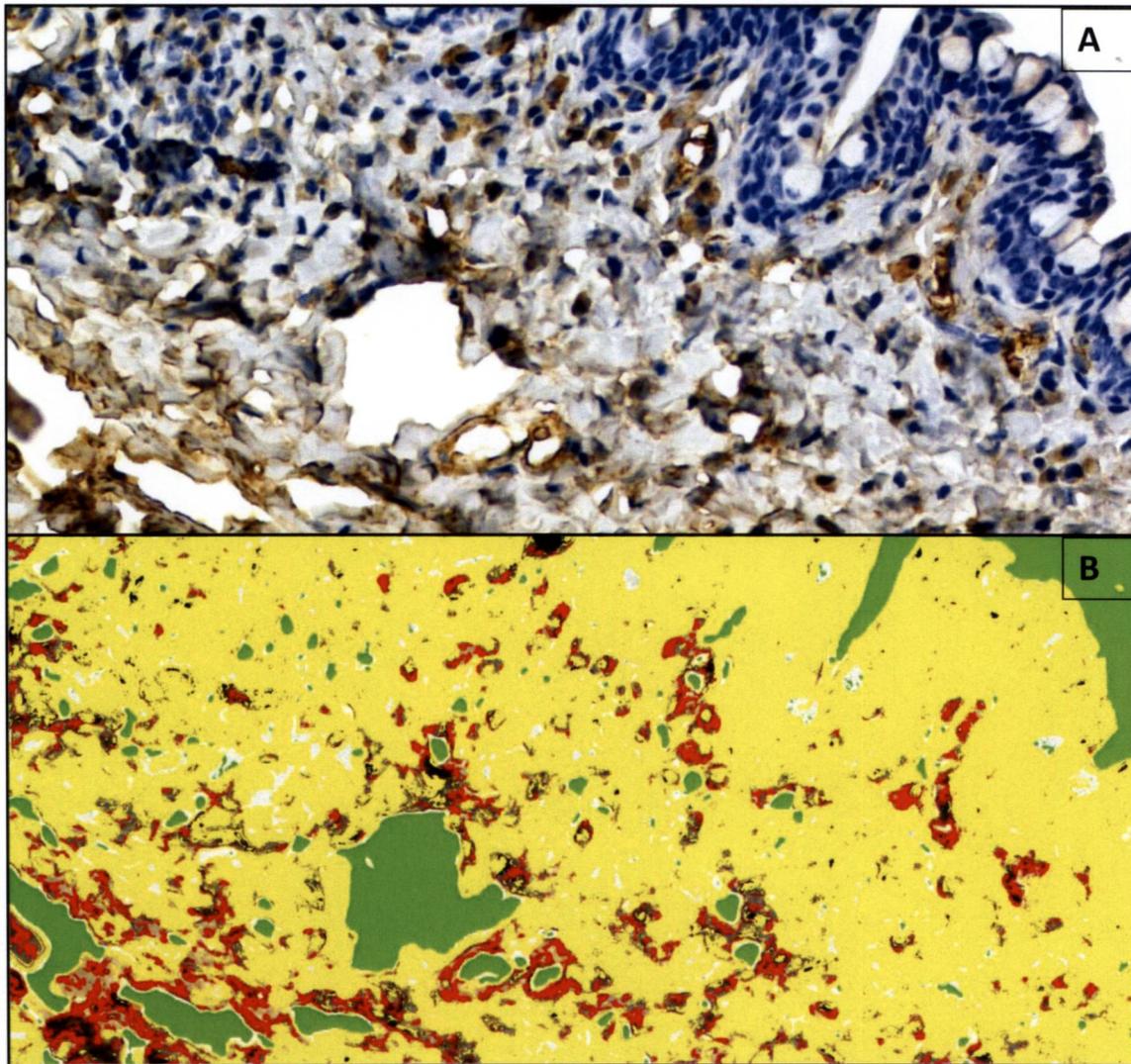
No total, foram determinados quatro marcadores imuno-histoquímicos para a avaliação da reação inflamatória causada pelo BAK e a ação da ciclosporina sobre a mesma na conjuntiva de coelhos: os anticorpos anti-colágeno I e anti-colágeno III, para avaliar grau de fibrose inflamatória; anti-VCAM-1 (Novocastra Laboratories Ltd, Inglaterra, na diluição 1:200), para avaliação de vasos sanguíneos reativos; e anti-CD45RO (BD Biosciences Pharmingen, EUA, na diluição 1:800) para avaliação de linfócitos T reativos.

Após a marcação dos quatro anticorpos em cada grupo, as lâminas de TMA marcadas foram escaneadas pelo scanner automatizado de slides para microscopia de campo claro e fluorescência (Axio Scan Z1®, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). Posteriormente, por meio do software de edição Zen 2.3 blue edition (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), foram selecionados e fotografados, em

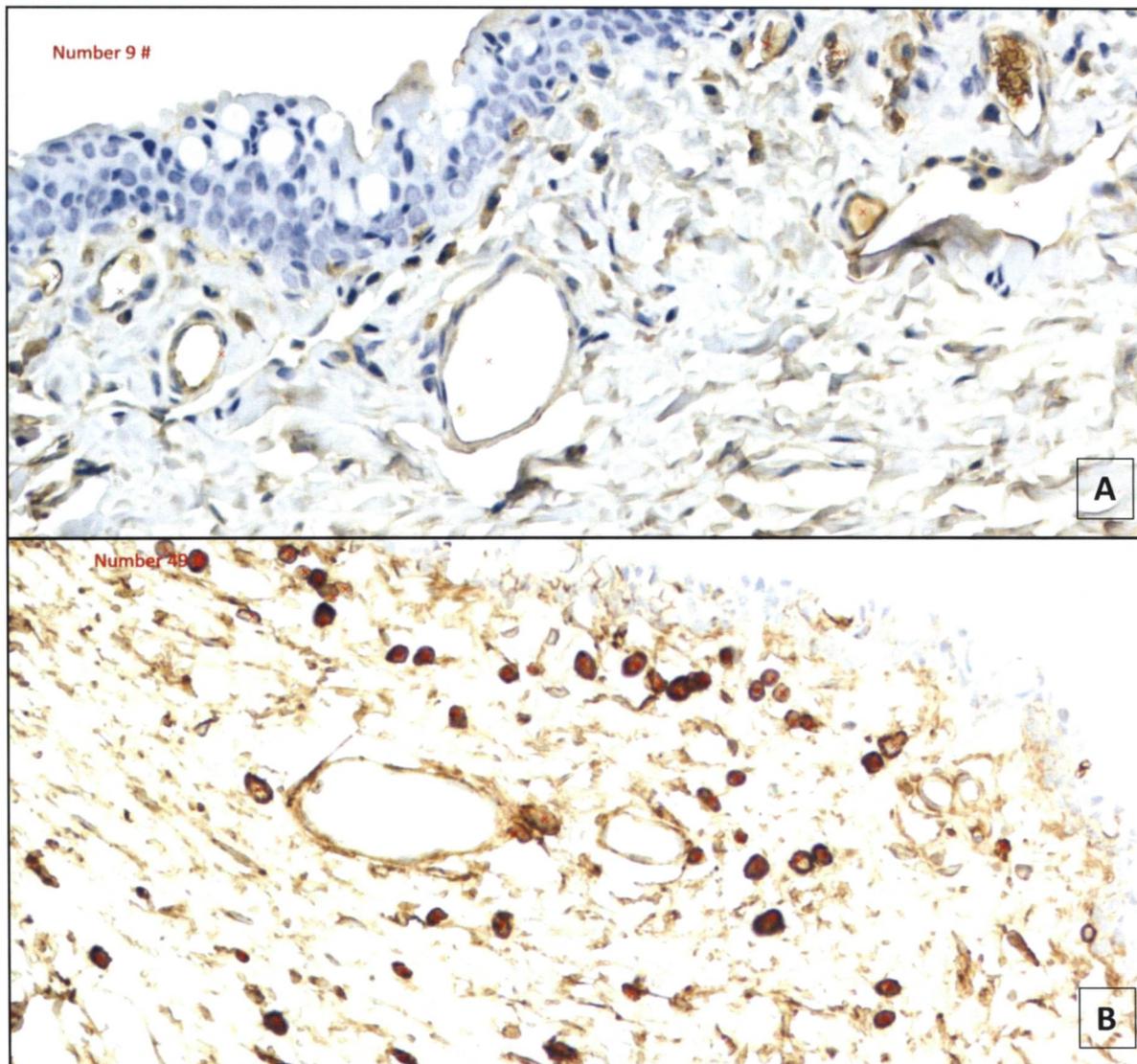
objetiva de aumento 200x, até três campos (quando possível) de cada fragmento de cada lâmina para então serem analisados individualmente. Isto é, cada grupo (1 - BAK, 2 - ciclosporina e 3 - BAK + ciclosporina) apresentou duas lâminas por marcador (uma para os olhos direitos controles e outra para os olhos esquerdos tratados), totalizando seis lâminas por marcador. Cada lâmina foi composta por até 20 fragmentos (cinco olhos de coelhos com quatro fragmentos palpebrais cada) e de cada fragmento foram selecionados até três campos, ou seja, foram selecionados até 60 campos por grupo (tratado e controle) para a análise.

Para a análise das amostras marcadas com o anticorpo anti-colágeno I e anti-colágeno III utilizou-se o software @Image ProPlus 4 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), o qual estabeleceu a proporção, em porcentagem, do tecido fibroso marcado em relação ao tecido total de cada campo fotografado (Figura 2.3).

Para a análise das amostras marcadas com os anticorpos anti-VCAM-1 e anti-CD45RO, realizou-se a contagem dos vasos e linfócitos reativos marcados em cada campo selecionado (200x), novamente com o auxílio do software de edição Zen 2.3 blue edition (Figura 2.4).



**Figura 2. 3. A:** Fotomicrografia (20x) de um dos campos selecionados de um fragmento conjuntival em uma lâmina de TMA marcada com o anticorpo anti-colágeno I. A coloração marrom no tecido corresponde às fibras de colágeno I marcadas com o anticorpo. **B:** Utilização do software @Image Pro plus 4 sobre a fotomicrografia para realçar em vermelho o colágeno I marcado. O amarelo corresponde ao tecido não marcado e o verde corresponde às áreas de ausência de tecido, assim como algumas regiões em branco. A proporção se estabeleceu da relação entre a quantidade de objetos marcados em vermelho e o total de tecido da amostra (objetos em vermelho + objetos em amarelo) = objetos vermelhos/ (objetos vermelhos + amarelos) x 100, dando em porcentagem a quantidade de colágeno I marcado por campo.



**Figura 2. 4.** Fotomicrografias dos campos em aumento de 200 x de amostras marcadas com anticorpo anti-VCAM-1 (A) e anti-CD45RO (B). Na foto "A", a coloração marrom presente na parede dos vasos e estroma subjacente indica positividade para o VCAM-1, marcando vasos sanguíneos reativos. Na foto "B", a coloração marrom escura indica positividade para o CD45RO, marcando os linfócitos T reativos. Utilizou-se o software de edição Zen 2.3 para a seleção dos campos e contagem, tanto dos vasos quanto dos linfócitos, os quais estão identificados com um "x" vermelho, sendo os totais identificados no canto superior esquerdo de cada foto (9 e 49 respectivamente).

Local:

A fase experimental do estudo ocorreu no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (UFPR) após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias. A confecção das lâminas de TMA e demais marcadores, assim como a análise imuno-histoquímica das amostras,

foram realizadas no Laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR.

#### Análise estatística:

Após tabulação dos resultados em planilha eletrônica, as diferenças entre os grupos foram comparadas empregando-se o teste de ANOVA para investigar diferenças entre variáveis contínuas numéricas de distribuição normal. As comparações entre o mesmo grupo (olho direito e olho esquerdo) foram realizadas com teste-t pareado, enquanto as comparações de todos os grupos contra todos os grupos foram realizadas com ANOVA de medidas repetidas com pós-teste de Tukey. Valores de  $P$  menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

## 2.5 RESULTADOS

Ao final do experimento, antes da eutanásia, tanto os grupos tratados somente com o BAK quanto os que foram tratados com BAK + ciclosporina apresentavam sinais nítidos de inflamação nos olhos esquerdos tratados, com intensidades variadas de secreção ocular, hiperemia conjuntival, quemose e neovascularização corneana (Figura 2.8). Alguns olhos tratados com BAK + ciclosporina aparentavam, inclusive, estarem mais inflamados que os olhos tratados somente com o BAK. Todos os grupos (tratados e controles) foram comparados estatisticamente entre si para cada marcador avaliado. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

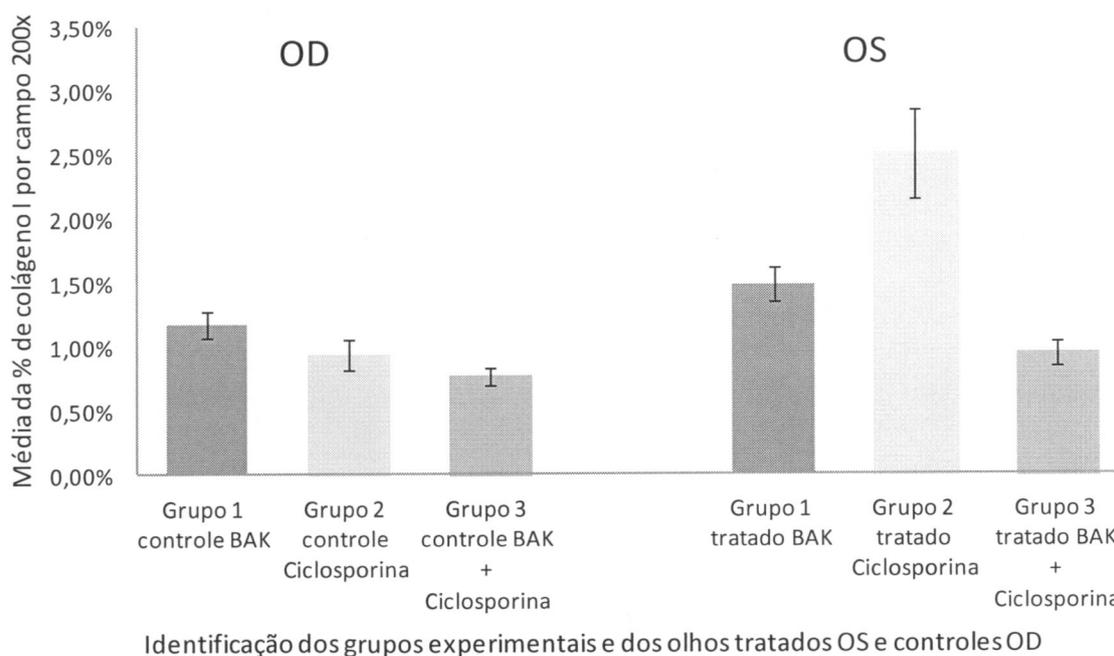
*Colágeno tipo I – marcador imuno-histoquímico anti-colágeno I*

Na análise das lâminas marcadas com anti-colágeno I os resultados mostraram que os olhos esquerdos tratados do Grupo 3 (BAK + ciclosporina) apresentaram menor média da porcentagem de colágeno tipo I por campo presente no tecido conjuntival, enquanto que os olhos tratados somente com ciclosporina (Grupo 2) apresentaram maior média de colágeno tipo I marcado, sendo o Grupo 1 (BAK) intermediário em relação aos demais (Tabela 2.1) (Figura 2.5). Os principais resultados estatísticos estão demonstrados na Tabela 2.2.

**Tabela 2. 1.** Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da porcentagem de colágeno tipo I por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles:

	Grupo 1 (BAK) %	Grupo 2 (ciclosporina) %	Grupo 3 (BAK + ciclosporina) %
OD (controle)	1,17 $\pm$ 0,67 $\pm$ 0,10	0,93 $\pm$ 0,63 $\pm$ 0,12	0,76 $\pm$ 0,44 $\pm$ 0,06
OS (tratado)	1,48 $\pm$ 0,92 $\pm$ 0,12	2,51 $\pm$ 2,16 $\pm$ 0,34	0,94 $\pm$ 0,62 $\pm$ 0,09

BAK = cloreto de benzalcônio; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo.



**Figura 2. 5.** Médias das porcentagens de colágeno tipo I por campo (200x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS).

**Tabela 2. 2.** Comparação das médias das porcentagens de colágeno tipo I por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD(1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD(2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD(3C); Grupo 1 BAK Tratado OS(1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS(2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS(3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Grupo (média % ± Desvio padrão %) X Grupo (média % ± Desvio padrão %)	Valor de p	S
1C (1,17 ± 0,67) x 1T (1,48 ± 0,92)	0,1681	-
1T (1,48 ± 0,92) x 3C (0,76 ± 0,44)	0,0010	S
1T (1,48 ± 0,92) x 3T (0,94 ± 0,62)	0,0144	S
1T (1,48 ± 0,92) x 2C (0,93 ± 0,63)	0,0313	S
1T (1,48 ± 0,92) x 2T (2,51 ± 2,16)	< 0,0001	S
3C (0,76 ± 0,44) x 3T (0,94 ± 0,62)	0,4199	-
3T (0,94 ± 0,62) x 2T (2,51 ± 2,16)	< 0,0001	S
2C (0,93 ± 0,63) x 2T (2,51 ± 2,16)	< 0,0001	S

BAK = cloreto de benzalcônio; ciclosp. = ciclosporina 0,05%; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo; S = Significante.

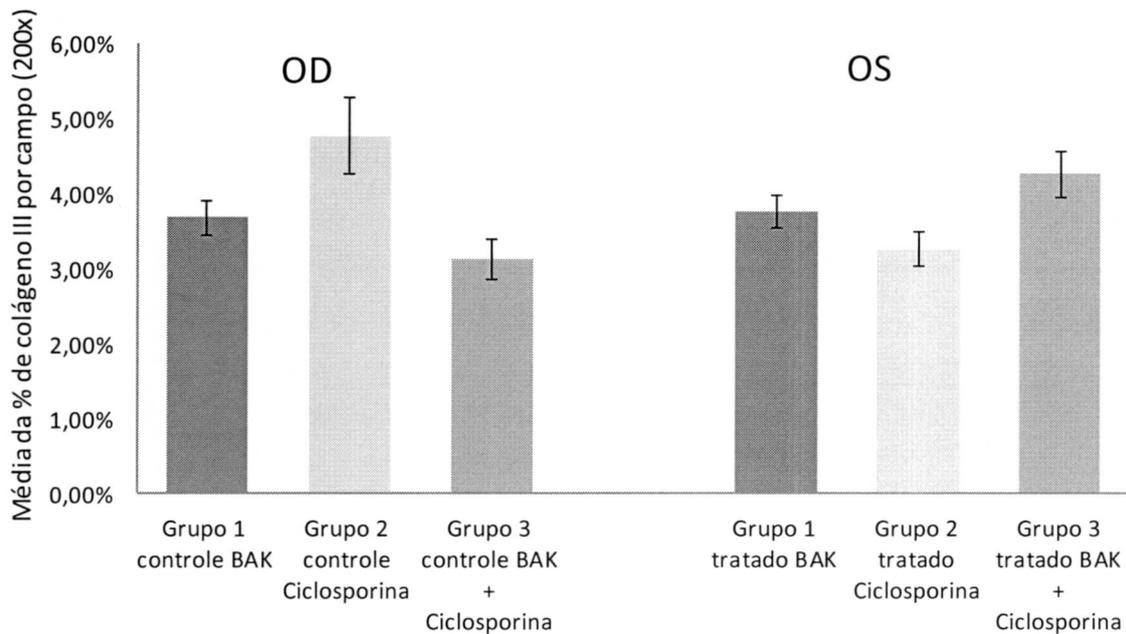
### *Colágeno tipo III – marcador imuno-histoquímico anti-colágeno III*

Na análise das lâminas marcadas com anti-colágeno III os resultados mostraram que os olhos esquerdos tratados do Grupo 3 (BAK + ciclosporina) apresentaram maior média da porcentagem de colágeno tipo III por campo presente no tecido conjuntival, enquanto que os olhos tratados somente com ciclosporina (Grupo 2) apresentaram menor média de colágeno tipo III marcado, sendo o Grupo 1 (BAK) intermediário em relação aos demais (Tabela 2.3) (Figura 2.6). Os principais resultados estatísticos estão demonstrados na Tabela 2.4.

**Tabela 2. 3.** Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média ± desvio-padrão ± erro-padrão) da porcentagem de colágeno tipo III por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles:

	Grupo 1 (BAK) %	Grupo 2 (ciclosporina) %	Grupo 3 (BAK + ciclosporina) %
OD (controle)	3,69 ± 1,43 ± 0,22	4,77 ± 2,63 ± 0,50	3,13 ± 1,87 ± 0,276
OS (tratado)	3,77 ± 1,61 ± 0,22	3,27 ± 1,40 ± 0,22	4,27 ± 2,04 ± 0,30

BAK = cloreto de benzalcônio; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo.



Identificação dos grupos experimentais e dos olhos tratados OS e controles OD

**Figura 2. 6.** Médias das porcentagens de colágeno tipo III por campo (200x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS).

**Tabela 2. 4.** Comparação das médias das porcentagens de colágeno tipo III por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Grupo (média % ± Desvio padrão %) X Grupo (média % ± Desvio padrão %)	Valor de p	S
1C (3,69 ± 1,43) x 1T (3,77 ± 1,61)	0,8328	-
1T (3,77 ± 1,61) x 3T (4,27 ± 2,04)	0,1790	-
1T (3,77 ± 1,61) x 2T (3,27 ± 1,40)	0,1993	-
3C (3,13 ± 1,87) x 3T (4,27 ± 2,04)	0,0032	S
3T (4,27 ± 2,04) x 2T (3,27 ± 1,40)	0,0133	S
2C (4,77 ± 2,63) x 2T (3,27 ± 1,40)	0,0012	S

BAK = cloreto de benzalcônio; ciclosp.= ciclosporina 0,05%; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo; S = Significante.

### Vasos sanguíneos reativos – marcador imuno-histoquímico anti-VCAM-1

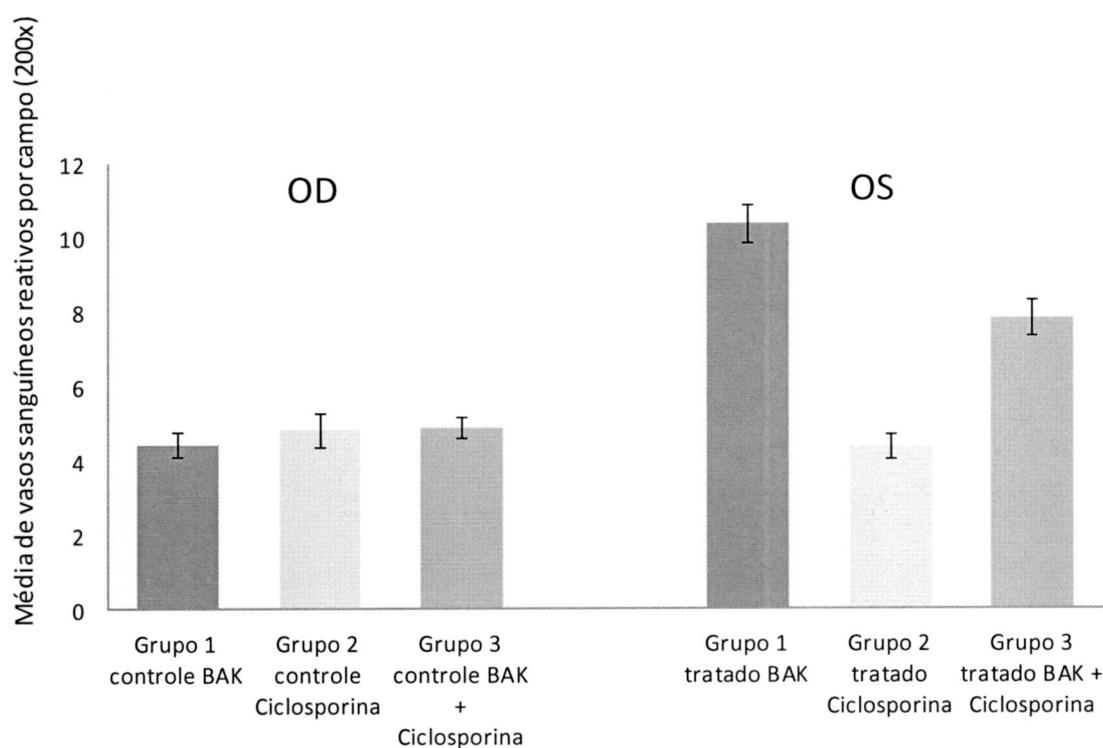
A resposta da conjuntiva ao anticorpo VCAM-1 para a detecção de inflamação do endotélio vascular mostrou que os olhos tratados com BAK (Grupo 1) apresentaram maior média do número de vasos sanguíneos reativos marcados por campo (200x), enquanto que os olhos tratados somente com a ciclosporina

(Grupo 2) apresentaram menor número de vasos marcado, sendo o Grupo 3 (BAK + ciclosporina) intermediário em relação aos demais (Tabela 2.5 e Figuras 2.7 e 2.8). Os principais resultados estatísticos estão demonstrados na Tabela 2.6.

**Tabela 2. 5.** Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de vasos sanguíneos reativos marcados por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles:

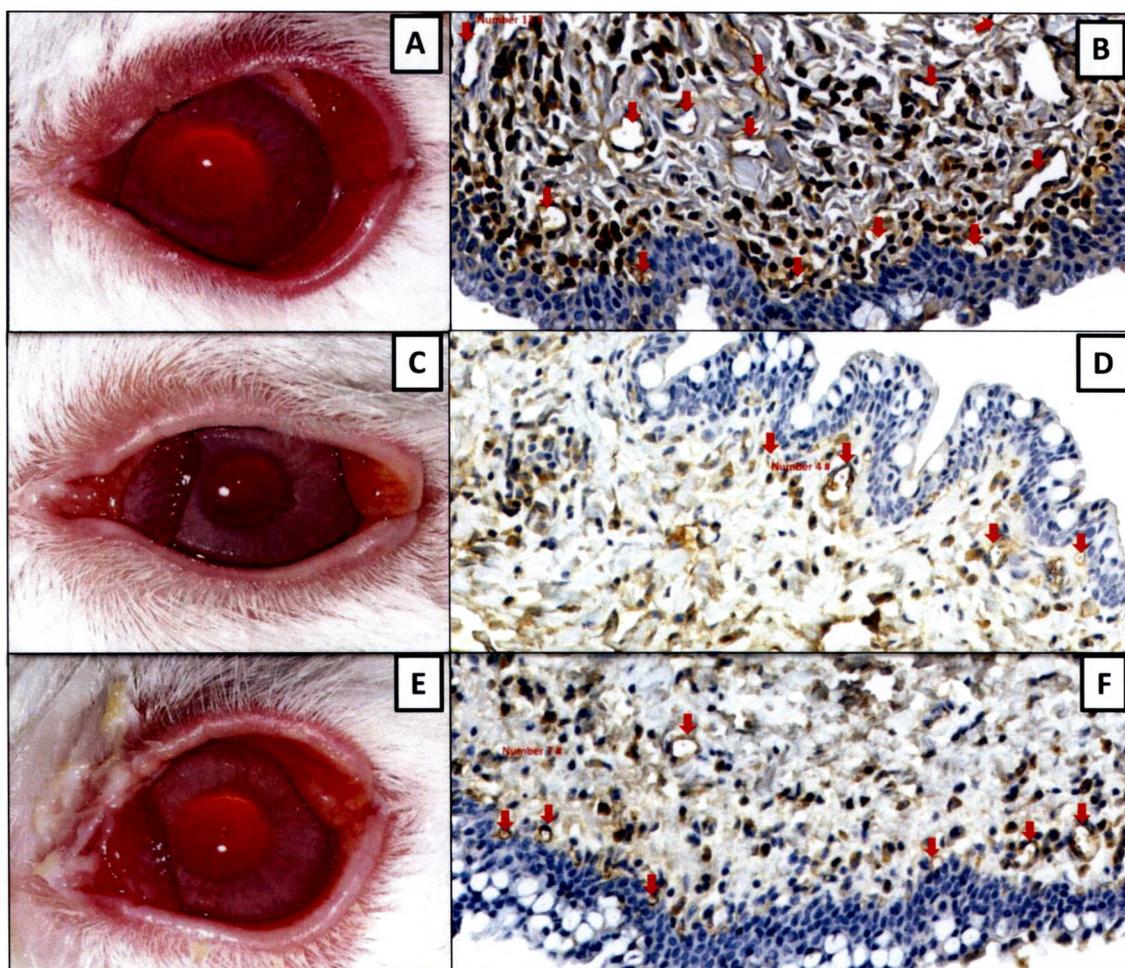
	Grupo 1 (BAK)	Grupo 2 (ciclosporina)	Grupo 3 (BAK + ciclosporina)
OD (controle)	4,43 $\pm$ 2,14 $\pm$ 0,35	4,81 $\pm$ 2,37 $\pm$ 0,45	4,89 $\pm$ 1,99 $\pm$ 0,29
OS (tratado)	10,38 $\pm$ 3,68 $\pm$ 0,51	4,38 $\pm$ 2,12 $\pm$ 0,34	7,86 $\pm$ 3,21 $\pm$ 0,84

BAK = cloreto de benzalcônio; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo.



Identificação dos grupos experimentais e dos olhos tratados OS e controles OD

**Figura 2. 7.** Médias do número de vasos sanguíneos reativos marcados nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS). Nota-se redução significativa da média do Grupo 2 e 3 em relação ao Grupo 1 nos olhos tratados.



**Figura 2. 8.** Comparação clínica e histológica entre os olhos esquerdos de cada grupo após 30 dias de tratamento com fotomicrografias representativas demonstrando a contagem de vasos sanguíneos reativos (setas vermelhas) por campo (200x) marcados com o anticorpo anti-VCAM-1. "A" e "B" correspondem ao Grupo 1 (BAK), "C" e "D" correspondem ao Grupo 2 (ciclosporina) e "E" e "F" correspondem ao Grupo 3 (BAK + ciclosporina).

**Tabela 2. 6.** Comparação do número de vasos sanguíneos reativos marcados por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS (2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Grupo (média $\pm$ Desvio padrão) X Grupo (média $\pm$ Desvio padrão)	Valor de p	S
1C (4,43 $\pm$ 2,14) x 1T (10,38 $\pm$ 3,68)	<0,0001	S
1T (10,38 $\pm$ 3,68) x 3T (7,86 $\pm$ 3,21)	< 0,0001	S
1T (10,38 $\pm$ 3,68) x 2T (4,38 $\pm$ 2,12)	< 0,0001	S
3C (4,89 $\pm$ 1,99) x 3T (7,86 $\pm$ 3,21)	< 0,0001	S
3T (7,86 $\pm$ 3,21) x 2T (4,38 $\pm$ 2,12)	< 0,0001	S
2C (4,81 $\pm$ 2,37) x 2T (4,38 $\pm$ 2,12)	0,5314	-

BAK = cloreto de benzalcônio; ciclosporina.= ciclosporina 0,05%; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo;  
S = Significante.

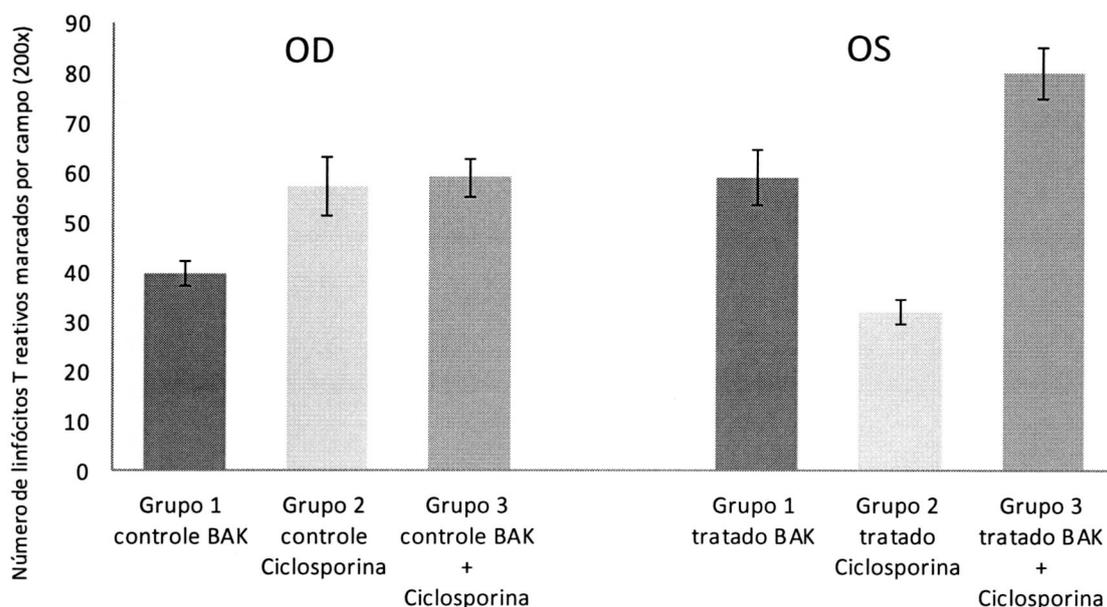
### *Linfócitos T reativos – marcador imuno-histoquímico anti-CD45RO*

A resposta da conjuntiva ao anticorpo anti-CD45RO para detecção de linfócitos reativos mostrou que os olhos esquerdos tratados do Grupo 3 (BAK + ciclosporina) apresentaram maior número de linfócitos marcados por campo no tecido conjuntival, enquanto que o menor número foi observado nos olhos tratados somente com ciclosporina (Grupo 2), sendo o Grupo 1 (BAK) intermediário em relação aos demais (Tabela 2.7) (Figura 2.8). Os principais resultados estão demonstrados na Tabela 2.8.

**Tabela 2. 7.** Médias, desvios-padrão e erros-padrão (média  $\pm$  desvio-padrão  $\pm$  erro-padrão) da contagem de linfócitos reativos marcados por campo (200x) em cada grupo e seus respectivos controles:

	Grupo 1 (BAK)	Grupo 2 (ciclosporina)	Grupo 3 (BAK + ciclosporina)
OD (controle)	39,59 $\pm$ 15,41 $\pm$ 2,46	57,25 $\pm$ 30,99 $\pm$ 5,96	59,13 $\pm$ 25,67 $\pm$ 3,78
OS (tratado)	59,37 $\pm$ 38,44 $\pm$ 5,54	32,12 $\pm$ 16,38 $\pm$ 2,62	80,34 $\pm$ 34,44 $\pm$ 5,19

BAK = cloreto de benzalcônio; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo.



Identificação dos grupos experimentais e dos olhos tratados OS e controles OD

**Figura 2. 9.** Médias do número de linfócitos T reativos marcados por campo (200x) nos diferentes grupos (BAK OD/OS, ciclosporina OD/OS e BAK + ciclosporina OD/OS).

**Tabela 2. 8.** Comparação do número linfócitos reativos marcados por campo entre os seguintes grupos: Grupo 1 BAK Controle OD (1C); Grupo 2 ciclosporina Controle OD (2C); Grupo 3 BAK + ciclosporina Controle OD (3C); Grupo 1 BAK Tratado OS (1T); Grupo 2 Ciclosporina Tratado OS(2T); Grupo 3 BAK + ciclosporina Tratado OS (3T). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

Grupo (média $\pm$ Desvio padrão) X Grupo (média $\pm$ Desvio padrão)	Valor de p	S
1C (39,59 $\pm$ 15,41) x 1T (59,37 $\pm$ 38,44)	0,0015	S
1T (59,37 $\pm$ 38,44) x 3C (59,13 $\pm$ 25,67)	0,9670	-
1T (59,37 $\pm$ 38,44) x 3T (80,34 $\pm$ 34,44)	0,0005	S
1T (59,37 $\pm$ 38,44) x 2C (57,25 $\pm$ 30,99)	0,7590	-
1T (59,37 $\pm$ 38,44) x 2T (32,12 $\pm$ 16,38)	< 0,0001	S
3C (59,13 $\pm$ 25,67) x 3T (80,34 $\pm$ 34,44)	0,0005	S
3T (80,34 $\pm$ 34,44) x 2T (32,12 $\pm$ 16,38)	< 0,0001	S
2C (57,25 $\pm$ 30,99) x 2T (32,12 $\pm$ 16,38)	0,0005	S

BAK = cloreto de benzalcônio; ciclosp. = ciclosporina 0,05%; OD = Olho direito; OS= Olho esquerdo; S =Significante.

## 2.6 DISCUSSÃO

O estudo comprovou a ação deletéria do cloreto de benzalcônio na conjuntiva de coelhos. com doses elevadas e por tempo prolongado, induzindo formação de

fibrose, neovascularização e ativação intensa de linfócitos T reativos no tecido conjuntival. A associação da ciclosporina ao tratamento modificou alguns desses efeitos relacionados ao processo inflamatório.

A literatura é escassa no que diz respeito à composição molecular detalhada do tecido fibrovascular da conjuntiva saudável. Estudos demonstram que há predominância de colágeno I e III na substância própria (matriz extracelular) e colágeno IV na membrana basal do epitélio conjuntival e do endotélio vascular.<sup>8</sup> Os resultados do estudo mostraram que o colágeno tipo III prevaleceu em relação ao colágeno tipo I na matriz extracelular da conjuntiva de coelhos que não receberam tratamento (olhos controles). Já, os olhos do Grupo 3 que receberam o tratamento com BAK + ciclosporina apresentaram média significativamente menor da porcentagem de colágeno I no tecido conjuntival enquanto que o grupo tratado apenas com o BAK apresentou média significativamente maior. No grupo 3 (BAK + ciclosporina) houve uma tendência para que a média das porcentagens de colágeno III fosse maior que no Grupo 1 (BAK). A interpretação de ambos os resultados para o colágeno I e III nos Grupos 1 e 3 sugere que a ciclosporina possa ter retardado o processo de fibrose (remodelamento) da conjuntiva causado pela inflamação induzida pelo BAK dos olhos que foram tratados com ambas as drogas (Grupo 3). Sabe-se que o processo de fibrose e cicatrização dos tecidos em geral, incluindo a conjuntiva, envolve três fases: inflamação, proliferação e maturação. A fase proliferativa da cicatrização se caracteriza por elevação na concentração de fibroblastos, que produzem e depositam grande quantidade de colágeno tipo III, ocorrendo posteriormente a maturação, com remodelação e substituição das fibras colágenas do tipo III por fibras colágenas do tipo I.<sup>9</sup> Como no Grupo 3 há mais colágeno III e menos colágeno I em relação ao Grupo 1, a fase de maturação

possivelmente foi influenciada e retardada pela ciclosporina neste grupo. Um estudo realizado em 2015 por Labbé e colaboradores identificou uma interferência causada pelo BAK na formação de matriz extracelular, particularmente no remodelamento conjuntival devido ao aumento de metaloproteinases (MMP) pelos fibroblastos e ainda mostrou que a ciclosporina teve ação inibitória no indutor dessas MMP, auxiliando na homeostase da matriz extracelular no processo de inflamação.<sup>10</sup> O fato, inclusive, de não haver diferença significativa na comparação das médias de colágeno tipo I dos olhos tratados do Grupo 3 (BAK + ciclosporina) com todos os olhos controles do experimento, evidencia, também, que a associação da ciclosporina ao tratamento com BAK manteve a mesma quantidade pré-existente de colágeno tipo I que a quantidade presente nos olhos que não receberam tratamento algum, diferentemente do que ocorreu na comparação com olhos tratados apenas com o BAK (Grupo1), em que houve aumento significativo de colágeno I em relação aos olhos controles dos grupos 2 e 3, (exceto em relação aos olhos controles do próprio Grupo 1). Isto comprova que o BAK estimula a formação de fibrose no tecido conjuntival no processo inflamatório, corroborando com estudos que inclusive utilizaram concentrações menores de BAK para identificar a fibrose conjuntival BAK-induzida, sendo esta uma consequência da produção excessiva de matriz extracelular por fibroblastos conjuntivais, por meio de ativação modulada pela ciclo-oxigenase-2 (COX-2) no processo inflamatório.<sup>11-13</sup>

Foi observado que a ciclosporina administrada individualmente induziu produção de colágeno tipo I na matriz extracelular saudável. Isso porque a média da porcentagem de colágeno tipo I nos olhos tratados somente com ciclosporina no Grupo 2 foi significativamente maior quando comparada às médias dos outros grupos. Além disso, houve redução proporcional de colágeno tipo III apenas nos

olhos tratados com ciclosporina (Grupo 2). Este aumento do colágeno tipo I nos olhos sem sinais de inflamação pode ser justificado pela comprovada ação inibitória da ciclosporina sobre as metaloproteinases de matriz (grupo de enzimas responsáveis pela degradação de componentes da *matriz extracelular*). Estudos comprovam que a ciclosporina aumenta a expressão de colágeno tipo I em fibroblastos gengivais, causando aumento gengival em pacientes que necessitam de tratamento imunossupressor com a droga por esta induzir modificações quantitativas do componente da matriz extracelular, principalmente pela inibição de metaloproteinases de matriz – 1 (MMP-1), enzima também denominada “colagenase”. Os dados desses estudos sugerem que o colágeno tipo I acumulado durante o sobrecrecimento gengival induzido pela ciclosporina pode ser sustentado principalmente por uma alteração da degradação de colágeno tipo I devido à diminuição da atividade da MMP-1.<sup>14,15</sup>

Além da ação inibitória sobre a produção das metaloproteinases de matriz, a ciclosporina também apresenta ação inibitória sobre o COX-2 na inflamação, o qual modula a ativação de fibroblastos na conjuntiva iniciando o processo de fibrose.<sup>16</sup> Portanto, a ciclosporina demonstrou apresentar ações importantes sobre a regulação da matriz extracelular no processo inflamatório e desregulação da mesma fora dele.

Neste estudo, os olhos tratados com BAK (Grupo 1) apresentaram maior média do número de vasos sanguíneos marcados pelo anticorpo VCAM-1, indicando que o processo inflamatório causado pelo BAK estimulou a angiogênese e inflamação vascular. O contato e rolamento de linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos

sobre o endotélio dos vasos sanguíneos conjuntivais ativa uma proteína CD106 que contribui ativamente para adesão celular e extravasamento dessas células para a matriz extracelular na inflamação, podendo ser detectada na corrente sanguínea, na própria parede do vaso ou ainda no tecido extravascular adjacente.<sup>17-19</sup> A detecção da proteína CD106 é realizada imuno-histoquimicamente por um anticorpo monoclonal denominado VCAM-1 (Vascular Cellular Adesion Molecule). A liberação de citocinas inflamatórias junto ao recrutamento dessas células estimula a angiogênese para o sítio da inflamação, aumentando o número de vasos sanguíneos os quais também serão ativados por essa proteína, que por sua vez permitirá o extravasamento de mais células inflamatórias. Estudos anteriores já comprovaram a ação de drogas hipotensoras associadas ao BAK sobre a inflamação vascular, demonstrando um aumento da detecção de VCAM-1, além de aumento da contagem e espessura da parede dos vasos.<sup>1, 20, 21</sup>

A associação da ciclosporina ao BAK no Grupo 3 demonstrou redução significativa da resposta ao anticorpo VCAM-1, apresentando média significativamente menor do número de vasos sanguíneos reativos em comparação ao grupo tratado apenas com BAK. Este resultado evidencia a ação anti-inflamatória da ciclosporina e supressão da angiogênese, que é modulada pela liberação de citocinas inflamatórias. Uma dessas citocinas é o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), estimulando a angiogênese. Este necessita de ativação pelo Fator Nuclear de Células T Ativadas (NFAT) para induzir a expressão gênica da COX-2 nas células endoteliais dos vasos.<sup>22</sup> Uma vez que a ciclosporina tem sua principal ação na inibição de células T, há inibição de NFAT e COX-2, logo, a angiogênese estimulada e mantida pelo VEGF também é inibida.<sup>16,23</sup> Outra citocina estimulante da angiogênese é a Interleucina 6 (IL-6) e estudos *in vitro* comprovam

que a ciclosporina apresentou resposta positiva na redução da mesma em modelos inflamatórios.<sup>24,25</sup> Além da IL-6, a ciclosporina também atua na redução de Interleucina 2 (IL-2) e Interferon Gamma (INF-g) as quais atuam na ativação de macrófagos. Estes estão diretamente relacionados com a angiogênese, liberando enzimas proteolíticas responsáveis por causar instabilidade vascular.<sup>26,27</sup> A inibição dessas citocinas inibe a ativação de macrófagos, diminuindo a neovascularização por este mecanismo.<sup>23</sup> Todos esses fatores justificam o possível mecanismo pelo qual a ciclosporina reduziu a angiogênese frente à ação do BAK.

Não houve diferença estatística entre os olhos do Grupo 2 tratados somente com ciclosporina em relação aos demais grupos controles, sugerindo que a ciclosporina não tem ação sobre os vasos pré-existentes, impedindo apenas a angiogênese de origem inflamatória.

Apesar de a ciclosporina atuar positivamente na redução da neovascularização induzida pela inflamação, o mesmo não foi observado em relação a ativação de linfócitos T reativos. Grande parte da inflamação da conjuntiva de coelhos é mediada por essas células, seguidas pela participação de macrófagos de forma menos expressiva.<sup>28</sup> Os linfócitos T reativos possuem uma subunidade heterogênea intracelular denominada CD45RO e esta é identificada por seu anticorpo na imuno-histoquímica. A resposta da conjuntiva ao anticorpo anti-CD45RO foi significativamente maior nos olhos tratados do grupo que recebeu a associação da ciclosporina ao tratamento com o BAK (Grupo 3), maior, inclusive, que o Grupo 1, que recebeu apenas o BAK. Por este motivo, sugere-se que a ciclosporina associada ao tratamento não influenciou na reação inflamatória de recrutamento de linfócitos T causado pelo BAK. Observou-se a ação da ciclosporina

na supressão de linfócitos T apenas no grupo que recebeu o tratamento individual com a mesma (Grupo 2), sem o estímulo inflamatório do BAK.

A concentração alta de BAK utilizada neste estudo pode ter induzido uma resposta inflamatória exacerbada no que tange ativação de linfócitos T reativos, a ponto do emprego da ciclosporina na concentração 0,05%, mesmo a cada 6 horas, não ter sido suficiente para bloquear com eficiência a caucineurina nessas células, não sendo capaz de impedir a liberação das citocinas de recrutamento de mais linfócitos T reativos (principalmente IL-2). Vale afirmar que concentração de 0,1% do BAK para este estudo foi determinada baseada em trabalhos que utilizaram em experimentações *in vitro* concentrações maiores que as utilizadas comercialmente em colírios (0,005% a 0,02%), porém menores que 0,1% (variando de 0,06 a 0,09%)<sup>29-31</sup> e, também, em estudos que utilizaram uma concentração ainda maior (0,2%) em coelhos.<sup>32</sup>

São inúmeros os estudos que comprovam a ação inibitória da ciclosporina sobre a ativação de linfócitos T na conjuntiva, tanto na síndrome do olho seco como nas doenças auto-imunes da superfície ocular<sup>33-35</sup>. Do mesmo modo, são inúmeros os que comprovam a ação do BAK e drogas antiglaucomatosas sobre a ativação de linfócitos T.<sup>1, 20, 21,36,37</sup> Em contrapartida a literatura é escassa, principalmente no que diz respeito ao infiltrado linfocitário, quando se trata da ação da ciclosporina em associação com agentes inflamatórios, como o BAK em drogas antiglaucomatosas. Alguns até demonstram a ação benéfica da ação da ciclosporina na inibição da apoptose epitelial e produção de citocinas por linfócitos T na conjuntiva de coelhos tratados com drogas antiglaucomatosas preservadas com BAK, porém poucos evidenciam quantitativamente a proliferação celular específica. Além disso, a

maioria desses estudos utilizaram concentrações de BAK iguais às normalmente encontradas em fármacos antiglaucomatosos.<sup>38,39</sup>

Um fato interessante foi que as médias do número de linfócitos T reativos nos olhos controles do Grupo 2 e 3 (que não receberam tratamento) não apresentaram diferença significativa em comparação com a média de linfócitos T nos olhos tratados com o BAK (Grupo1). Devido a esta ocorrência, suspeita-se que de alguma forma houve certo grau inflamatório em alguns olhos controles. Descarta-se a possibilidade de absorção sistêmica e influência dos olhos tratados sobre os olhos contralaterais pelo fato de um desses grupos ser dos olhos controles do Grupo 2, grupo este tratado apenas com a ciclosporina. Uma possível justificativa para isso, o que também explicaria a resposta significativamente maior da reação ao anti-CD45RO nos olhos tratados do Grupo 3 (BAK + ciclosporina), seria a proximidade do chão em que esses grupos estiveram no decorrer do experimento devido à disposição das gaiolas no biotério. Por conta deste arranjo espacial das gaiolas, os grupos 2 e 3 permaneceram muito mais próximos ao que acumulava mais urina durante o dia em comparação aos animais do Grupo 1, que ficaram em gaiolas mais altas. Nota-se, inclusive, que os olhos controles do Grupo 1 não apresentaram resposta elevada ao anticorpo anti-CD45RO como os olhos controles do Grupo 2 e 3. Por mais que se realizasse a lavagem do biotério duas vezes ao dia, a amônia liberada próximo a esses animais do grupo 2 e 3 pode ter sido responsável por uma maior ativação de linfócitos T na conjuntiva desses animais.

Por fim, conclui-se que os resultados obtidos nesse estudo confirmaram o que se observou clinicamente em cada grupo antes da eutanásia. Apesar da associação da ciclosporina junto ao BAK no Grupo 3, era evidente um processo inflamatório dos olhos tratados, tanto no grupo 1(BAK) quanto no grupo 3 (BAK + ciclosporina), por

mais que a angiogênese e fibrose conjuntival inflamatórias tenham sido atenuadas com a ação da ciclosporina. Este estudo demonstrou claramente a ação benéfica da ciclosporina sobre o endotélio vascular e, inesperadamente, resultados que abrirão novas perspectivas no que tange os tratamentos tópicos contínuos com a ciclosporina, uma vez que se observou maior expressão de colágeno I e fibrose em olhos não inflamados e tratados pela droga.

## 2.7 REFERÊNCIAS

1. Lima, L. Alterações Morfológicas da Conjuntiva de Coelhos Submetidos a Tratamento com Fármacos Antiglaucomasos Tópicos Com e Sem Conservantes. Dissertação de tese de doutorado. 2014, Curitiba.
2. Rockey D.C, Bell P.D, Hill J.A. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *The New England Journal of Medicine*. 2015; v. 372 n.12, p:1138–1149.
3. Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, *et al.* Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *European Journal of Ophthalmology*, 2007, 17: 341-349.
4. Baudouin, C., Labbé A, Liang H, *et al.* Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2010, v. 29, n. 4, p. 312-334.
5. Turacli, E, Gündüz K., Aktan G., *et al.* A comparative clinical trial of mitomycin C and cyclosporine A in trabeculectomy. *European Journal of Ophthalmology*. 1996; v. 6, n. 4, p:398-401.
6. Garcia S.C, Lopes L.S., Schott K.L, *et al.* Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2004, v.40, n. 6, p: 393-401.
7. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*. 1998; v. 4, n. 7, p:844–7.
8. Abu el-Asrar A.M, Geboes K, al-Kharashi S.A, *et al.* Collagen content and types in trachomatous conjunctivitis. *Eye (London)*. 1998; v. 12 n.4, p:735-9.

9. Ribeiro F.A.Q, Carvalho M.F.P, Pereira C.S.B, *et al.* Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. Arquivos médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa. São Paulo. 2015, v. 60, p:22-6.
10. Labbé A, Gabison E, Brignole-Baudouin F, *et al.* Increased extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression in the conjunctival epithelium exposed to antiglaucoma treatments. Current Eye Research. 2015, v. 40 n.1, p:40-7.
11. Nuzzi R., Vercelli A., Finazzo C., *et al.* Conjunctiva and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 1995, v.233, p:154–162.
12. Huang C., Wang H., Pan J. *et al.* Benzalkonium chloride induces subconjunctival fibrosis through the COX-2–modulated activation of a TGFb1/Smad3 signaling pathway. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2014; v. 55, p:8111–22.
13. Bonniard A.A, Yeung J.Y, Chan C.C *et al.* Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK): Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2016.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2016.1209481>
14. Gagliano N., Moscheni C., Dellavia C., *et al.* Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2004, v. 58, n.4, p:231-8
15. Chung Y., Fu E, Chin Y.T., *et al.* Role of Shh and TGF in cyclosporine-enhanced expression of collagen and  $\alpha$ -SMA by gingival fibroblast. Journal of Clinical Periodontology. 2015, v. 42, n.1, p:29-36.

16. Martin M., Neumann D., Hoff T., *et al.* Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney International*. 1994, v. 45, n.1, p:150-8.
17. Shi S.R., Gu J., Kaira K.L., *et al.* The monoclonal CD106 vascular cellular adesion molecule. *Cell Vision*. 1995; v. 2, p: 6-22.
18. Walpola P.L, Gottlieb A.I, Cybulsky M.L, *et al.* Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995, v. 15, p: 2-10.
19. Stern M.E, Gao J, Schwalb T. A, *et al.* Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2002; v. 43, p: 2609–2614.
20. Russ H.H, Costa V.P, Ferreira F.M *et al.* Conjuntival changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate: a histomorphometric study. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*. 2007, v.70, p: 910–916.
21. Faria N.V.L, Russ H.H, Rose P, *et al.* Conjuntival changes and inflammatory aspects in rabbits' conjuntivas induced by fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol maleate. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 2013, v. 3, p: 22.
22. Hernandez G.L., Volpert O.V, Iniguez M.A., *et al.* Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: Roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001. v.193, n.5, p:607-620.
23. Milani J.F., Barros P.S.M., Guerra J.L, Brooks D.E. Effects of topical 0.2% Cyclosporine A on corneal neovascularization induced by xenologous

amniotic membrane implantation into a corneal stroma micropocket of rats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008, v.28, n.8, p:379-386.

24. Shetty, R.; Ghosh, A.; Lim, R.R.; *et al.* Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2015, v. 56, n. 2, p. 738–50.
25. Ghasemi H. Roles of IL-6 in Ocular Inflammation: A Review. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2017, v. 1, p:1-14.
26. Hingorani M., Calder V.L., Buckley T.J., *et al.* The immunomodulatory effect of topical cyclosporin A in atopic keratoconjunctivitis *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1999, v. 40, n.2, p:392-399.
27. Auerbach W., Auerbach R. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacology & Therapeutics*. 1994, v.63, p:265-311.
28. Liu H., Meagher C.K, Moore C.P, Phillips T.E. Antigen sampling M cells in the rabbit conjunctiva. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004; v. 45, p: 150
29. Seibold, L.K, Ammar, D.A, Kahook, M.Y. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity in vitro. *Current Eye Research*, 2013, v.38, n.1, p: 70-74.
30. Ammar, D. A, Noecker, R.J, Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Advances in Therapy*, 2010, v.27, n. 11, p: 837-45.

31. Ammar, D. A, Noecker, R.J, Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride- and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells. *Advances in Therapy*, 2011, v. 28, n.6, p: 501-10.
32. 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*, 2012, v. 7, n.11, e:50180.
33. Wan K.H, Chen L.J, Young A.L. Efficacy and Safety of Topical 0.05% Cyclosporine Eye Drops in the Treatment of Dry Eye Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Ocular Surface*. 2015, v. 13, n.3, p:213-25
34. Erdinest N., Solomon A. Topical immunomodulators in the management of allergic eye diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2014, v. 14, n.5, p:457-63
35. Thomas P.B, Samant D.M, Zhu Z., *et al.* Long-term topical cyclosporine treatment improves tear production and reduces keratoconjunctivitis in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2009, v.25, n.3, p:285-92.
36. Kahook MY, Noecker RJ. Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofzia, latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears. *Cornea*. 2008, v. 27, p: 339–343
37. Liang H, Baudouin C, Pauly A *et al.* (2008) Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short- and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0.02% benzalkonium chloride. *British Journal of Ophthalmology*, v. 92, p: 1275–1282.

38. Cho H.K, Park M.H, Moon J.I. The effect of additional topical cyclosporine or vitamin A on the ocular surface during antiglaucoma medication administration. *Ophthalmic Research*. 2012. v. 48, n.3. p:139-45.
39. Saini M., Dhiman R., Dada T., *et al*. Topical cyclosporine to control ocular surface disease in patients with chronic glaucoma after long-term usage of topical ocular hypotensive medications. *Eye (London)*. 2015, v. 29, n.6, p: 808–814.

## ANEXOS E APÊNDICES

### 3.1 – Aprovação do Comitê de ética no Uso de Animais – CEUA - PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2014.

#### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 869 – 1ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:** Efeitos do preservativo cloreto de benzalcônio e ciclosporina nas conjuntivas de coelho estudo histomorfométrico e imuno-histoquímico.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Thiago Alegre Coelho Ferreira

**EQUIPE DE PESQUISA:** Alegre Coelho Ferreira, Fabiano Motiani, Heloisa Russ, Nubia Vanessa, Rafael Zotz.

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:**

Convenio Biotério PUCPR / UFPR

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Fêmea	5 meses / 2 kg	C / Mediato	18

O colegiado do CEUA em reunião no dia 27/02/2014, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer:

**APROVADO.**

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Marta Luciano Fischer  
Coordenadora  
Comitê de Ética no Uso de Animais.

Profª Dra. Marta Luciano Fischer  
Coordenadora Comitê de Ética  
no uso de animais



### **3.2 – VITA**

Médica veterinária formada pela Universidade Federal do Paraná no ano de 2010. Coursou residência multidisciplinar da saúde atuando na área de Oftalmologia Veterinária no Hospital Veterinário da UFPR, no período entre março de 2013 e fevereiro de 2015. Coursou o Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, entre março de 2015 e março de 2017. Atua na área de Oftalmologia Veterinária de pequenos animais.

## REFERÊNCIAS GERAIS

1. Abu el-Asrar A.M, Geboes K, al-Kharashi S.A, *et al.* Collagen content and types in trachomatous conjunctivitis. *Eye* (London). 1998; v. 12 n.4, p:735-9.
2. Ammar, D. A, Noecker, R.J, Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Advances in Therapy*, 2010, v.27, n. 11, p. 837-45.
3. Ammar, D. A, Noecker, R.J, Kahook, M.Y. Effects of benzalkonium chloride- and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells. *Advances in Therapy*, 2011, v. 28, n.6, p. 501-10.
4. Arici M.K., Arici D.S., Topalkara A., *et al.* Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2000, 28:113–117.
5. Auerbach W., Auerbach R. Angiogenesis inhibition: A review. *Pharmacology & Therapeutics*. 1994, v.63, p:265-311.
6. Baudouin C., Hamard P., Liang H., *et al.* Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology*, 2004, 111:2186–2192.
7. Baudouin, C., Labbé A, Liang H, *et al.* Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2010, v. 29, n. 4, p. 312-334.
8. Belin M.W., Bouchard C.S., Phillips T.M. Update on topical cyclosporine A. Background, immunology, and pharmacology. *Cornea*, 1990, 9:184-95.
9. Bonniard A.A, Yeung J.Y, Chan C.C *et al.* Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK): Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2016.1209481>
10. 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*, 2012, v. 7, n.11, e:50180.
11. Chen M., Gong L., Sun X., *et al.* A comparison of cyclosporine 0.05% ophthalmic emulsion versus vehicle in Chinese patients with moderate to severe dry eye disease: an eight-week, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group trial. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2010, 26:361-6.
12. Cho H.K, Park M.H, Moon J.I. The effect of additional topical cyclosporine or vitamin A on the ocular surface during antiglaucoma medication administration. *Ophthalmic Research*. 2012. v. 48, n.3. p:139-45.
13. Chung Y., Fu E, Chin Y.T., *et al.* Role of Shh and TGF in cyclosporine-enhanced expression of collagen and  $\alpha$ -SMA by gingival fibroblast. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015, v. 42, n.1, p:29-36.
14. Costa M. A.; Reis R. F.; Furtado M. J.; *et al.* Efeitos da Medicação Tópica Antiglaucomatosa na Superfície Ocular. *Oftalmologia*, 2012, v. 36, p. 117-122.
15. Diggors, P., Franks, W. A. Glaucoma therapy may take your breath away. *Age and Ageing*, 1997, v.26, p.63-67.
16. Erdinest N., Solomon A. Topical immunomodulators in the management of allergic eye diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2014, v. 14, n.5, p:457-63
17. Faria N.V.L, Russ H.H, Rose P, *et al.* Conjunctival changes and inflammatory aspects in rabbits' conjunctivas induced by fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol maleate. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 2013, 3: 22.
18. Fechtner R.D., Godfrey D.G., Budenz D., *et al.* Prevalence of ocular surface complaints in patients with glaucoma using topical intraocular pressure-lowering medications. *Cornea*, 2010, 29:618–621.
19. Gagliano N., Moscheni C., Dellavia C., *et al.* Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2004, v. 58, n.4, p:231-8
20. Garcia S.C, Lopes L.S., Schott K.L, *et al.* Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2004, v.40, n. 6, p: 393-401.
21. Ghasemi H. Roles of IL-6 in Ocular Inflammation: A Review. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2017, v. 1, p:1-14.
22. Gordon, M.O., Beiser, J.A., Brandt, *et al.* The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 2002, v. 120, n. 6, p. 714-20.
23. Hernandez G.L., Volpert O.V, Iniguez M.A., *et al.* Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: Roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001. v.193, n.5, p:607-620.
24. Herreras, J., Pastor J. C, Calonge M., *et al.* Ocular Surface Alteration after Long-term Treatment with an Antiglaucomatous Drug. *Ophthalmology*, 1992, v. 99, n. 7, p. 1082-1088.
25. Hingorani M., Calder V.L., Buckley T.J., *et al.* The immunomodulatory effect of topical cyclosporin A in atopic keratoconjunctivitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1999, v. 40, n.2, p:392-399.
26. Huang C., Wang H., Pan J. *et al.* Benzalkonium chloride induces subconjunctival fibrosis through the COX-2–modulated activation of a TGF $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014; v. 55, p:8111–22.
27. Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A, Zeyen T. Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *European Journal of Ophthalmology*, 2007, 17: 341-349.
28. Kahook MY, Noecker RJ. Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofzia, latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears. *Cornea*. 2008, v. 27, p: 339–343
29. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*. 1998; v. 4, n. 7, p:844–7.
30. Labbé A, Gabison E, Brignole-Baudouin F, *et al.* Increased extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression in the conjunctival epithelium exposed to antiglaucoma treatments. *Current Eye Research*. 2015, v. 40 n.1, p:40-7.
31. Leung E.W, Medeiros F.A., Weinreb R.N. Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. *Journal of Glaucoma*, 2008, 17:350–355.
32. Liang H, Baudouin C, Pauly A *et al.* (2008) Conjunctival and corneal reactions in rabbits following short- and repeated exposure to preservative-free tafluprost, commercially available latanoprost and 0.02% benzalkonium chloride. *British Journal of Ophthalmology*, v. 92, p: 1275–1282.
33. Lima, L. Alterações Morfológicas da Conjuntiva de Coelhos Submetidos a Tratamento com Fármacos Antiglaucomatosos Tópicos Com e Sem Conservantes. Dissertação de tese de doutorado. 2014, Curitiba.
34. Liu H., Meagher C.K, Moore C.P, Phillips T.E. Antigen sampling M cells in the rabbit conjunctiva. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004; v. 45, p: 150

35. Lockington D., Macdonald E.C., Stewart P., et al. Free radicals and the pH of topical glaucoma medications: a lifetime of ocular chemical injury? *Eye (Lond)*, 2012, 26:734–741.
36. Martin M., Neumann D., Hoff T., et al. Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney International*. 1994, v. 45, n.1, p:150-8.
37. Mathews P.M., Ramulu P.Y., Friedman D.S., et al. Evaluation of ocular surface disease in patients with glaucoma. *Ophthalmology*, 2013, 120:2241–2248.
38. Matsuda S., Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 2000, 47:119-25.
39. Milani J.F., Barros P.S.M., Guerra J.L., Brooks D.E. Effects of topical 0.2% Cyclosporine A on corneal neovascularization induced by xenologous amniotic membrane implantation into a corneal stroma micropocket of rats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008, v.28, n.8, p:379-386.
40. Nuzzi R., Vercelli A., Finazzo C., et al. Conjunctiva and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Graefes Archive of Clinical and Experimental Ophthalmology*, 1995, 233:154–162.
41. Ribeiro F.A.Q., Carvalho M.F.P., Pereira C.S.B., et al. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. *Arquivos médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa. São Paulo*. 2015, v. 60, p:22-6.
42. Ritch, R.; Shields, B.; Krupin, T. Pharmacology. In: Ritch, R., Shields, M.B., Krupin, T. *The glaucomas*. 2ª ed. St. Louis: Mosby, 1996, vol.3, p.1375-1489.
43. Rockey D.C, Bell P.D, Hill J.A. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *The New England Journal of Medicine*. 2015; v. 372 n.12, p:1138–1149.
44. Russ H.H, Costa V.P, Ferreira F.M et al. Conjunctival changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate: a histomorphometric study. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*. 2007, v.70, p: 910–916.
45. Saini M., Dhiman R., Dada T., et al. Topical cyclosporine to control ocular surface disease in patients with chronic glaucoma after long-term usage of topical ocular hypotensive medications. *Eye (London)*. 2015, v. 29, n.6, p: 808–814.
46. Schwab I.R., Linberg J.V., Gioia V.M., et al. Foreshortening of the inferior conjunctival fornix associated with chronic glaucoma medications. *Ophthalmology*, 1992, 99:197–202.
47. Seibold, L.K, Ammar, D.A, Kahook, M.Y. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity in vitro. *Current Eye Research*, 2013, v.38, n.1, p. 70-74.
48. Shetty, R.; Ghosh, A.; Lim, R.R.; et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2015, v. 56, n. 2, p. 738–50.
49. Shi S.R., Gu J., Kaira K.L., et al. The monoclonal CD106 vascular cellular adhesion molecule. *Cell Vision*. 1995; v. 2, p: 6-22.
50. Skalicky S.E., Goldberg I., Mccluskey P. Ocular surface disease and quality of life in patients with glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 2012, 153(1):1–9, e2.
51. Stern M.E, Gao J, Schwalb T. A, et al. Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2002; v. 43, p: 2609–2614.
52. Steuhl K.P., Knorr M., Frohn A., et al. Effect of anti-glaucoma eye drops on cell differentiation of the conjunctiva. *Fortschritte der Ophthalmologie*, 1991, 88:865–9.
53. Takahashi N. Quantitative cytotoxicity of preservatives evaluated in cell culture with Chang's human conjunctival cells-effect of temperature on cytotoxicity. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 1982, 26:234-238.
54. Thomas P.B, Samant D.M, Zhu Z., et al. Long-term topical cyclosporine treatment improves tear production and reduces keratoconjunctivitis in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2009, v.25, n.3, p:285-92.
55. Turacli E., Budak K., Kaur A., et al. The effects of long-term topical glaucoma medication on conjunctival impression cytology. *International Ophthalmology*, 1997, 21:27–33.
56. Turacli, E, Gündüz K., Aktan G., et al. A comparative clinical trial of mitomycin C and cyclosporine A in trabeculectomy. *European Journal Ophthalmology*. 1996 Oct-Dec; 6(4):398-401.
57. Urtti, A., Salminen. Minimizing Systemic Absorption of Topically Administered Ophthalmic Drugs. *Survey of Ophthalmology*, 1993, v.37, n.6. p. 435-56.
58. Utine C.A., Stern M., Akpek E.K. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporine A. *Ocular Immunology and Inflammation*, 2010, 18:352-61.
59. Zuccotti G.V., Fabiano V. Safety issues with ethanol as an excipient in drugs intended for pediatric use. *Expert Opinion on Drug Safety*, 2011, 10(4): 499-502.
60. Walpola P.L, Gotlieb A.I, Cybulsky M.L, et al. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995, v. 15, p: 2-10.
61. Wan K.H, Chen L.J, Young A.L. Efficacy and Safety of Topical 0.05% Cyclosporine Eye Drops in the Treatment of Dry Eye Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Ocular Surface*. 2015, v. 13, n.3, p:213-25
62. Weinreb, R. N; Medeiros, F. A. Como definir o glaucoma? In: SUSANNA JUNIOR, R.; WEINREB, R. N. *Glaucoma: Perguntas e Respostas*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005, p.1-7.
63. Wilson W.S., Duncan A.J., Jay J.L. Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *British Journal of Ophthalmology*, 1975, 59: 667-669.
64. Wilson S.E., Perry H.D. Long-term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. *Ophthalmology*, 2007, 114:76-9.