

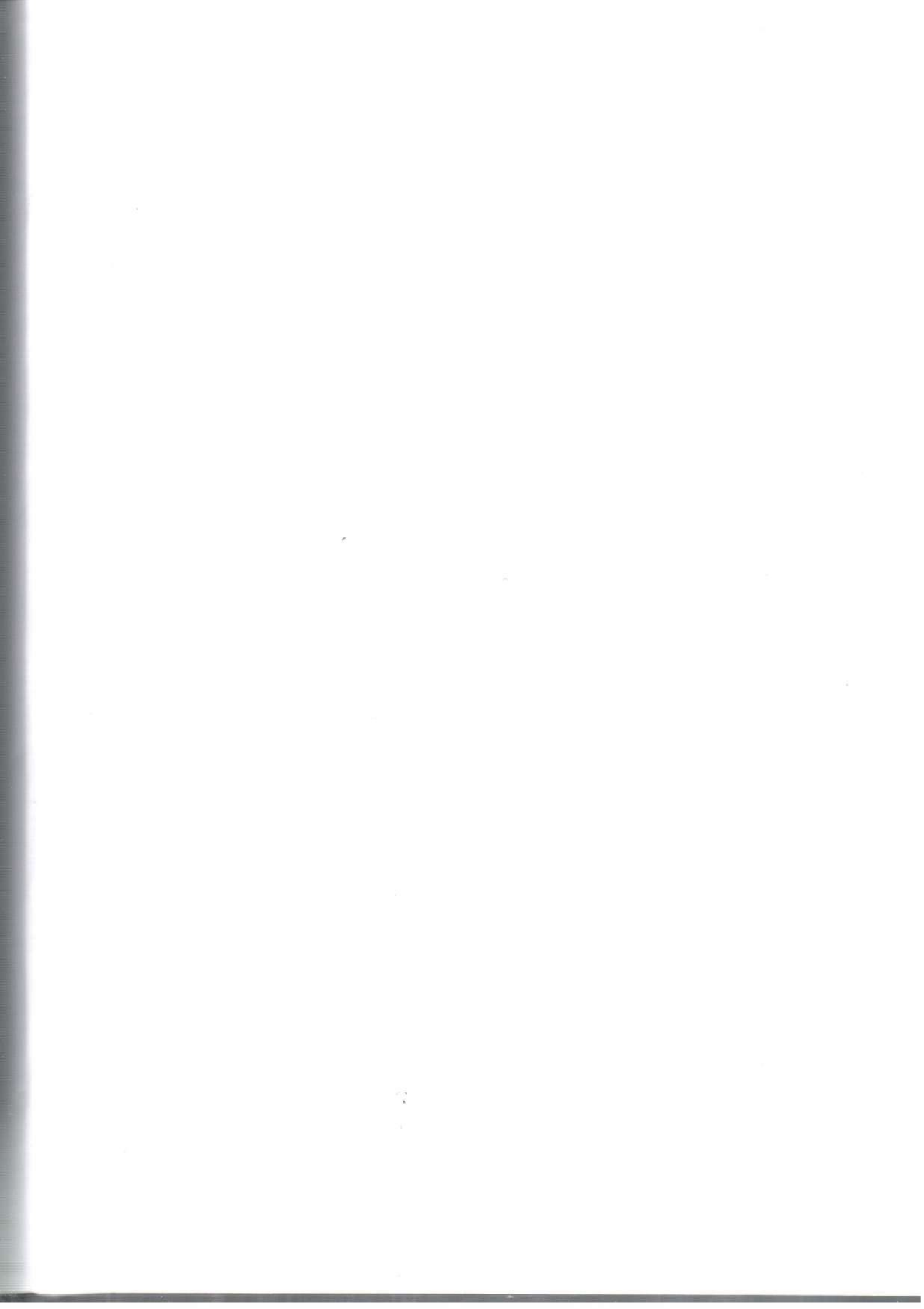
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

ALTERAÇÕES CONJUNTIVAIS INDUZIDAS POR
DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DO GLAUCOMA

NUBIA VANESSA LIMA DE FARIA

BELO HORIZONTE

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Leir Coelho
ALTERAÇÕES CONJUNTIVAS INDUZIDAS POR
DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DO GLAUCOMA

NUBIA VANESSA LIMA DE FARIA

BELO HORIZONTE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Reitor: **Prof. Clélio Campolina Diniz**

Vice-Reitora: **Profa. Rocksane de Carvalho Norton**

Pró-Reitor de Pós-Graduação: **Prof. Ricardo Santiago Gomez**

Pró-Reitor de Pesquisa: **Prof. Renato de Lima dos Santos**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Francisco José Penna**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Tarcizo Afonso Nunes**

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha**

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: **Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari**

Chefe do Departamento de Cirurgia: **Prof. Marcelo Eller Miranda**

Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia: **Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: **Prof. Marcelo Dias Sanches**

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: **Profa. Ivana Duval de Araújo**

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia:

Prof. Marcelo Dias Sanches Profa. Ivana Duval de Araújo Prof. Tarcizo Afonso Nunes Prof. Alcino Lázaro da Silva Prof. Renato Santiago Gomes Prof. Márcio Bittar Nehemy

Sumara Marques Barral – Representante Discente titular Hevila Tamar Rolim Lima– Representante Discente suplente

Dissertação defendida em 13/08/2012, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Sebastião Cronemberger Sobrinho/Orientador – UFMG

Profa. Heloisa Helena Abil Russ Giacometti/ Coorientadora - UFPR

Profa. Ana Rosa Pimentel de Figueiredo – UFMG

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos – UFMG

Prof. Jair Giampani Junior – UFMT

Profa. Wilma Lelis Barbosa Lorenzo Acácio – USP

Membros Suplentes:

Prof. Wesley Ribeiro Campos– UFMG

Profa. Maria Regina Catai Chalita- UNB

NUBIA VANESSA LIMA DE FARIA

eye colho

**ALTERAÇÕES CONJUNTIVAS INDUZIDAS POR
DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DO GLAUCOMA**

Programa

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Sebastiao Cronemberger

Co-orientadora: Dra Heloisa Helena Abil Russ
Giacometti

BELO HORIZONTE

2012

AGRADECIMENTOS

À Deus, Nossa Senhora e ao Divino Espírito Santo por me guiar, proteger e me abençoar todos os dias.

Aos meus pais, Arlinson e Niva, por me ensinar valores que estarão sempre comigo, pelo amor incondicional, pelo suporte e por me mostrar continuamente a importância da educação e de se perseguir sonhos.

Ao meu esposo, Hélio, pelas horas ausentes, que ao perseguir meu sonho, não estive com você. Você me deu a razão de viver.

A minha filha, Jordana, por tornar minha vida mais plena desde que chegou, com seu sorriso meigo, um choro manhoso e por me fazer saber o que é amar.

Aos meus irmãos, Naissa e Narson, pelo companheirismo, carinho e horas de conversas fraternais que sempre trazem um sorriso e acalento ao coração.

Ao meu sobrinho Bernardo, pela sua energia e vibração. Você é nosso presente de Deus.

As minhas tias e primas Batistas e minha Avó Stelita, por nos ensinar a nunca desistir de um sonho.

Minha Amiga-Irmã, Giselle, por todas as palavras de carinho, dedicação e puxões de orelhas. E ao seu esposo, Mauro e meus sobrinhos Giulia e João Pedro.

A amiga e orientadora Heloisa Helena Russ, obrigada por ter me ajudado em mais esta conquista profissional, me orientando e sempre disposta a corrigir nossos trabalhos.

Ao professor Sebastião Cronemberger, por ter me orientado, permitindo meu crescimento educacional.

Ao Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, em especial à Dra. Lúcia Noronha pela paciência e pelo bom humor.

À Dra. Palloma Rose, pela parceria em frente a um microscópio e dúvidas intermináveis nos posteres.

Aos amigos Heloísa Maestrini, Luciana Campos, Adriana Sobral, Ana Paula Tupynambá, Alessandra Paiva, Erika Miura, Alessandro Sousa, Fabio Kanadani, Bruno Figueiredo que presentes ou distantes sempre estiveram comigo.

Aos amigos e chefes Dr. Jaime, Dr. Jardim e Dr. Sidney, pelas palavras sábias nas horas de tensão.

“Se começarmos com certezas, acabaremos com
dúvidas; mas, se começarmos com dúvidas, e formos pacientes,
acabaremos com certezas”.

F. Bacon

RESUMO

O glaucoma é uma neuropatia óptica que tem como principal fator de risco pressão intraocular elevada, que leva à perda progressiva e morte das células ganglionares da retina, o que acarreta redução progressiva do campo visual e, finalmente, perda da visão. A terapia do glaucoma baseia-se na tentativa de redução da pressão intraocular, por meio de medicamentos ou de procedimentos cirúrgicos. O timolol é uma droga já consagrada para este fim, que atua reduzindo a produção do humor aquoso. Na década de 90, surgiram os análogos de prostaglandinas (PG) (latanoprost, travoprost e bimatoprost), hipotensores que aumentam o fluxo de drenagem do humor aquoso pela via uveoscleral. Mais recentemente, foram lançadas as combinações fixas dos análogos de PG com o maleato de timolol. A instilação crônica destes colírios pode incitar alterações patológicas na conjuntiva contribuindo para o insucesso de intervenções cirúrgicas, como a trabeculectomia. A terapia tópica crônica também pode causar a redução do número de células caliciformes, responsáveis pela produção da porção mucosa do filme lacrimal, o que reduz a quantidade e a qualidade da lágrima e contribui para o desconforto ocular. Esta pesquisa testou três combinações de análogos de PG e timolol (Ganfort® - bimatoprost+timolol, Duo-Travatan® - travoprost+timolol e Xalacom® - latanoprost+timolol) por meio de avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica. Todas as combinações testadas induziram algum grau de resposta inflamatória conjuntival. A intensidade da alteração de cada parâmetro avaliado (infiltrado inflamatório, espessura epitelial e número de células caliciformes) variou de acordo com a droga utilizada. A combinação menos deletéria foi a bimatoprost+timolol, que causou infiltrado inflamatório intermediário quando comparada às outras combinações, e ainda provocou maior aumento no número de células caliciformes. Outra parte da pesquisa foi a investigação do uso de ciclosporina (Restasis®) e prednisolona (Predfort®) no pós-operatório da trabeculectomia, que mostrou que a associação destas drogas tem um efeito sinérgico na inibição da fibrose e da reação inflamatória pós-cirúrgica, havendo possibilidade da sua utilização para reduzir a aderência do *flap* cirúrgico, mantendo patente a trabeculectomia por maior período.

Palavras-chave: glaucoma, conjuntiva, histomorfometria, imunoistoquímica, ciclosporina, prednisolona

ABSTRACT

Glaucoma is a disease whose major risk factor is the increase of intraocular pressure (IOP), that leads to a progressive loss of retinal ganglion cells, causing a progressive reduction in visual field and, finally, blindness. Glaucoma's therapy is focused on reducing the IOP, using drugs or surgical techniques. Timolol is a drug already well-established for this purpose, reducing the aqueous humor production. In the 90's, the prostaglandin (PG) analogues appeared (latanoprost, travoprost and bimatoprost), which are hypotensive drugs that increase the aqueous humor outflow through uveoscleral way. More recently commercial combination of PG analogues and timolol were released, adding reduction of aqueous humor production with increase in its outflow. However, chronic instillation of eye drops incites inflammatory reaction in the conjunctiva, which can contribute to surgery failure, such as trabeculectomy. Chronic topic therapy can also induce a reduction in the number of goblet cells, responsible for producing the mucous part of lachrymal film, what reduces the quantity and quality of tears and contribute to ocular discomfort. This research tested three PG analogues and timolol combinations (Ganfort® - bimatoprost+timolol, Duo-Travatan® - travoprost+timolol and Xalacom® - latanoprost+timol), by histomorphometric and imunohistochemical evaluations. All tested combinations caused some degree of conjunctival inflammatory response. The intensity of change caused by each one of the evaluated parameters (inflammatory infiltrate, epithelial thickness and number of goblet cells) varied with each drug. The less deleterious combination was the bimatoprost+timolol, that caused an intermediary inflammatory infiltrate when compared to other drugs, and also provoked a greater increase in number of goblet cells. Another part of this research was the investigation of cyclosporine and prednisolone use in post-operative of trabeculectomy, showing that the association of these drugs has a synergic effect inhibiting post-surgical fibrosis and inflammatory reaction. Therefore, the combined use of cyclosporine and prednisolone can possibly reduce surgical flap adherence, keeping this way the trabeculectomy for longer time.

Key-words: glaucoma,, conjunctiva, histomorphometry, immunohistochemical, cyclosporine, prednisolone

Lista de Ilustrações

FIGURA 1	FOTOGRAFIA DE LAMINA HISTOLOGICA COM HE, DEMONSTRANDO AREA BULBAR E PALPEBRAL.....	17
FIGURA 2	TISSUE MICROARRAY (TMA) DO ESTUDO	29
FIGURA 3	FOTOGRAFIA DE LÂMINA HISTOLÓGICA CORADA COM HE, EVIDENCIANDO AS DUAS ÁREAS DE CONJUNTIVA BULBAR PRÓXIMAS AO LIMBO VENTRAL E DORSAL (CÍRCULOS), QUE FORAM AVALIADAS MICROSCOPICAMENTE.....	39
FIGURA 4	INTERFACE DO PROGRAMA IMAGE PRO-PLUS 4.5, MOSTRANDO UMA AVALIAÇÃO DE LÂMINA POR GRADEAMENTO (PARA MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS FORAM SELECIONADOS OS TRÊS QUADRANTES MAIS PRÓXIMOS AO EPITÉLIO CONJUNTIVAL, INDICADOS PELA ELIPSE).....	40
FIGURA 5	FOTOMICROGRAFIAS DE CONJUNTIVAS (MAGNIFICAÇÃO DE 400X) CORADAS COM HE, EVIDENCIANDO O AUMENTO DO NÚMERO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NOS OLHOS TRATADOS COM BIMATOPROSTA+TIMOLOL (B), TRAVOPROSTA+TIMOLOL (C) E LATANOPROSTA+TIMOLOL (D), EM RELAÇÃO AO OLHO SEM TRATAMENTO (A).....	44
GRAFICO 01	ESPESSURA EPITELIAL DA CONJUNTIVA DE COELHOS, COMPARANDO OS OLHOS CONTROLE AOS TRATADOS, ENTRE OS TRÊS GRUPOS DE TRATAMENTO: BIMATOPROSTA+TIMOLOL (G1), TRAVOPROSTA+TIMOLOL (G2) E LATANOPROSTA+TIMOLOL (G3). AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA REALIZADA COM HE.....	46
FIGURA 6	FOTOMICROGRAFIAS DE CONJUNTIVAS (400X) CORADAS COM HE, EVIDENCIANDO O AUMENTO DA ESPESSURA EPITELIAL NOS OLHOS TRATADOS COM BIMATOPROSTA+TIMOLOL (B), LATANOPROSTA+TIMOLOL (C) E TRAVOPROSTA+TIMOLOL (D), EM RELAÇÃO AO OLHO SEM TRATAMENTO (A).....	47

FIGURA 7	FOTOMICROGRAFIAS DE CONJUNTIVAS (MAGNIFICAÇÃO DE 400X) CORADAS COM PAS, EVIDENCIANDO O AUMENTO MAIS INTENSO DO NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES NOS OLHOS TRATADOS COM BIMATOPROSTA+TIMOLOL (B) E LATANOPROSTA+TIMOLOL (D), E MENOR NOS OLHOS TRATADOS COM TRAVOPROSTA+TIMOLOL (C), EM RELAÇÃO AO OLHO SEM TRATAMENTO (A).....	49
GRAFICO 02	GRAU DE FIBROSE DA CONJUNTIVA DE COELHOS, COMPARANDO OS OLHOS CONTROLE AOS TRATADOS, ENTRE OS TRÊS GRUPOS DE TRATAMENTO: BIMATOPROSTA+TIMOLOL (G1), TRAVOPROSTA+TIMOLOL (G2) E LATANOPROSTA+TIMOLOL (G3). NOTE O MAIOR GRAU DE FIBROSE NO GRUPO TRATADO COM TRAVOPROSTA+TIMOLOL. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA COM ANTI-ACTINA.....	51
FIGURA 8	FOTOMICROGRAFIAS DE CONJUNTIVAS (MAGNIFICAÇÃO DE 400X) MARCADAS COM ANTI-ACTINA, EVIDENCIANDO O AUMENTO NO NÚMERO DE FIBROBLASTOS NOS OLHOS TRATADOS COM TRAVOPROSTA+TIMOLOL (B), LATANOPROSTA+TIMOLOL (C) E BIMATOPROSTA+TIMOLOL (D), EM RELAÇÃO AO OLHO SEM TRATAMENTO(A).....	52
GRAFICO 03	COMPARAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE CONJUNTIVAL ENTRE OS TRÊS GRUPOS DE TRATAMENTO: PREDNISOLONA 1% (G1), CICLOSPORINA 0,05% (G2) E PREDNISOLONA 1% COM CICLOSPORINA 0,05% (G3). AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA COM ANTI-ACTINA, POR MEIO DE VARIÁVEIS NUMÉRICAS DISCRETAS (1: MÍNIMO; 2: LEVE; 3: MODERADO E 4: FORTE).....	67
FIGURA 9	FOTOMICROGRAFIAS DE CONJUNTIVA (MAGNIFICAÇÃO DE 400X) DA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA COM ANTI-ACTINA, EVIDENCIANDO OS FIBROBLASTOS DO SUBEPITÉLIO DOS SEGUINTE GRUPOS: A) CONTROLE; B) PREDNISOLONA; C) CICLOSPORINA; D) CICLOSPORINA+PREDNISOLONA.....	68
FIGURA 10	FOTOMICROGRAFIAS DE CONJUNTIVA (MAGNIFICAÇÃO DE 400X) DA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA COM ANTI-FATOR VIII, EVIDENCIANDO AS CÉLULAS	70

	ENDOTELIAIS DOS VASOS SANGÜÍNEOS REATIVOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO NOS SEGUINTE GRUPOS: A) CONTROLE; B) PREDNISOLONA; C) CICLOSPORINA; D) CICLOSPORINA+PREDNISOLONA.....	
	..	
FIGURA 11	FOTOMICROGRAFIAS DE CONJUNTIVAS (MAGNIFICAÇÃO DE 400X) DA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA COM ANTI-INTERLEUCINA-6, EVIDENCIANDO AS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS DO SUBEPITÉLIO NOS SEGUINTE GRUPOS: A) CONTROLE; B) PREDNISOLONA; C) CICLOSPORINA; D) CICLOSPORINA+PREDNISOLONA.....	73

Lista de Tabelas

TABELA 1	RESULTADOS DOS PARAMETROS : CELULAS INFLAMATORIAS;ESPESSURA EPITELIAL;CELULAS CALICIFORMES DOS TRÊS GRUPOS DE ANÁLOGOS DE PROSTAGLANDINAS+TIMOLOL, COMPARANDO OLHOS CONTROLE E OLHOS TRATADOS, APÓS 30 DIAS DE TRATAMENTO. TODOS OS VALORES ESTÃO APRESENTADOS COMO NÚMERO MÉDIO POR CAMPO DE MAGNIFICAÇÃO DE 400X,.....	43
TABELA 2	COMPARAÇÃO DOS PARAMETROS AVALIADOS ENTRE OS GRUPOS: PREDNISOLONA 1%; CICLOSPORINA 0,05% E ASSOCIAÇÃO DE AMBOS.....	72

Lista de Abreviaturas

Faltava
(ordenar)

GPAA	-	Glaucoma primário de ângulo aberto Pressão intraocular
PIO	-	Pressão intraocular
OHTS	-	Ocular Hypertension Treatment Study
EMGT	-	Early Manifest Glaucoma Trial
EMC	-	Edema Macular Cistóide
HE	-	Hematoxilina- Eosina
PGF _{2α}	-	Prostaglandina-F _{2α}
PAS	-	Ácido Periódico de Schiff
PG	-	Prostaglandina
TREC	-	Trabeculectomia
IHQ	-	Imunoistoquímica
μm	-	Micrômetro
H ₂ O ₂	-	Água Oxigenada
BAK	-	Cloreto de Benzalcônio (do inglês, <i>Benzalkonium Chloride</i>)
MMC	-	Mitomicina C
5-FU	-	5-Fluorouracil
IL	-	Interleucina

Po ou PIO ?

Fistulante ou Filtrante ?

Súmario

1 - GLAUCOMA: Definição e Tratamento	
1. Introdução	1
1.1 Tratamento Medicamentoso do Glaucoma	5
1.1.1. Agentes autonômicos Colinérgicos	5
1.1.1.1 Pilocarpina	5
1.1.2. Agentes autonômicos adrenérgicos	6
1.1.2.1. Alfa-agonistas	6
1.1.2.1.1. BRIMONIDINA	6
1.1.2.2. BETA-BLOQUEADORES	7
1.1.3. INIBIDORES DA ANIDRASE CARBONICA	9
1.1.3.1 Sistêmicos	9
1.1.3.2. TÓPICOS	10
1.1.4. PROSTAGLANDINAS	10
1.1.5. Associação de Drogas	13
	16
2. Avaliação da Superfície Ocular	
2.1. Anatomia Conjuntival	16
2.2. Técnicas para avaliação da conjuntiva	18
2.2.1. Biópsia conjuntival	18
2.2.2. Citologia conjuntival ou esfregaço conjuntival	19
2.2.3. Citologia de impressão	19
2.3. Consequências das alterações conjuntivais sobre o sucesso da cirurgia filtrante	20
	22
3. JUSTIFICATIVAS	
	23
4. OBJETIVOS	
	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	
5.1. Critérios de inclusão	25
5.2. Critérios de exclusão	25
5.3. Constituição de grupos	25
5.4. Métodos	26
5.4.1. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica	27
5.5. Análise estatística	31

em coelhos

**6- ARTIGO 01 - Alterações Conjuntivais Induzidas por
Combinações Fixas de Análogos de Prostaglandinas e Maleato
de Timolol: Aspectos Inflamatórios** 32

Resumo	32
Abstract	34
Introdução	36
Material e Métodos.	38
Resultados.	42
Discussão	53
Conclusão	56

**7- ARTIGO 02 - Tratamento da Reação Inflamatória Conjuntival
com Ciclosporina, Prednisolona e Associação de Ciclosporina e
Prednisolona no Pós-Operatório de Trabeculectomia em Coelhos** 57

Resumo	57
Abstract.	59
Introdução	60
Material e Métodos.	63
Resultados.	66
Discussão.	74
Conclusão	79

8- REFERÊNCIAS *Bibliográfica* 80

9- CONCLUSOES 103

10- ANEXOS 105

11- APENDICES 107



1. INTRODUÇÃO

O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é uma neuropatia óptica crônica, progressiva, de etiologia multifatorial, caracterizada por alterações típicas do disco óptico e da camada de fibras nervosas da retina, com repercussões características no campo visual. É acompanhado, na maioria das vezes, por pressões intra-oculares (PIOs) acima de níveis considerados estatisticamente normais. Considera-se o aumento da PIO o principal fator de risco para a instalação e progressão do glaucoma (Gordon et al., 2002; SBG, 2009).

Segundo dados da OMS de 2002, o glaucoma é a segunda maior causa de cegueira no mundo e a principal causa de cegueira irreversível, havendo cerca de cinco milhões e duzentos mil cegos por glaucoma no mundo (Thylefors et al., 1998; Resnikoff et al., 2004). Quigley (1997) estimava que dois milhões e quinhentos mil pacientes fossem portadores de glaucoma nos Estados Unidos na década passada e que mais de 130 mil pessoas estariam legalmente cegas pela doença.

O tratamento do GPAA e da hipertensão ocular é realizado por meio da redução da PIO, e visa evitar o estabelecimento ou progressão do dano ao nervo óptico e do defeito de campo visual. (Musch et al., 1999; Lichter et al., 2001; Tezel et al., 2001). Em geral, a redução da PIO nos pacientes com glaucoma é obtida, inicialmente, com terapia medicamentosa.

No Brasil há poucos estudos demonstrando a prevalência de glaucoma. Sendo esses estudos insuficientes no ponto de vista epidemiológicos pois retratam perfil regional das amostras, o que não pode

ser extrapolado para a realidade nacional (Sakata et al., 2007, Póvoa et al. 2001)

O *Ocular Hypertension Treatment Study* (OHTS), estudo multicêntrico realizado com 1637 pessoas diagnosticadas como hipertensas oculares (PIO entre 24 e 32 mmHg sem dano ao nervo óptico ou defeito de campo visual), randomizou pacientes para tratamento medicamentoso (cujo objetivo era promover redução de 20% da PIO inicial) ou observação (sem tratamento). Após período de seguimento de cinco anos, 4,4% dos pacientes tratados progrediram, enquanto 9,5% do grupo não-tratado progrediram. Este estudo concluiu que a redução da PIO diminui o risco de ^{conversão} progressão para glaucoma em pacientes com hipertensão ocular.

O OHTS também mostrou que um considerável número de pacientes requer múltiplas drogas para redução adequada da PIO. Após cinco anos, 49% dos pacientes necessitaram pelo menos duas medicações para reduzir a PIO, e 9% dos pacientes necessitaram três medicações (Kass et al., 2002). Deve-se enfatizar que a proposta de redução pressórica no OHTS foi modesta (apenas 20%), e que esses índices aumentariam caso fosse estabelecida como meta uma redução pressórica mais significativa.

Outro estudo multicêntrico desenvolvido na década de 90 foi o *Early Manifest Glaucoma Trial* (EMGT) que incluiu 255 pacientes com glaucoma em fase inicial, seguidos durante quatro anos. Nesse estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos: um deles foi submetido a tratamento (cujo objetivo era reduzir a PIO em 25% do valor inicial), e o segundo grupo não foi submetido a qualquer tratamento. O tratamento inicial foi realizado com

beta-bloqueadores (betaxolol), acrescido, se necessário, de latanoprostá ou trabeculoplastia a laser. O EMGT mostrou que 45% dos pacientes tratados progrediram, enquanto 62% dos não tratados apresentaram progressão da doença. (Leske et al, 1999).

O *Advanced Glaucoma Intervention Study* (AGIS) foi um estudo multicêntrico, com duração de oito anos, que envolveu 586 olhos de pacientes com glaucoma avançado. O AGIS revelou que o grupo de pacientes que ^{evl}mantiveram PIO menor que 18 mmHg em 100% das visitas ao longo dos 8 anos foi o que apresentou menores taxas de progressão (14,4% em 8 anos). Esse grupo, que apresentou PIO média de 12,3 mmHg, necessitou de associação de duas ou mais drogas para manter a PIO abaixo de 18 mmHg mesmo após trabeculectomia ou trabeculoplastia a laser. Assim, 33,6% dos pacientes desse grupo necessitou usar duas ou mais medicações para atingir PIO menor que 18 mmHg. (AGIS, 2000).

Os estudos supracitados revelam que a redução da PIO diminui o risco de progressão de indivíduos com hipertensão ocular, glaucoma inicial e glaucoma avançado. Além disso, sugerem que um grande número de pacientes requer mais de uma medicação para controlar adequadamente a PIO (AGIS, 2000; Lichter et al., 2001; Kass et al., 2002).

Entretanto, qualquer tratamento medicamentoso possui efeitos colaterais e sistêmicos. As drogas tópicas disponíveis para o tratamento do glaucoma serão listadas a seguir e seus efeitos colaterais, tópicos e sistêmicos.

1.1. TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DO GLAUCOMA

As drogas tópicas utilizadas no tratamento do glaucoma dividem-se em: agentes autonômicos, inibidores da anidrase carbônica e os análogos das prostaglandinas. Os agentes autonômicos subdividem-se em drogas atuantes no sistema colinérgico (parassimpático) e drogas que atuam no sistema adrenérgico (simpático) (Shields et al., 1998).

1.1.1 Agentes autonômicos colinérgicos

Os agentes autonômicos que atuam no sistema colinérgico utilizam como mediador fisiológico a acetilcolina, produzem miose e promovem aumento do escoamento de humor aquoso pela via trabecular.

1.1.1.1. Pilocarpina

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico que provoca miose por estimular o músculo esfíncter da íris e abre a malha trabecular, causando aumento do escoamento de humor aquoso pela via convencional. Atualmente, a pilocarpina é usada para reverter o bloqueio pupilar em casos de pacientes com glaucoma de ângulo fechado. A pilocarpina reduz o fluxo úveo-escleral, o que antagoniza o efeito dos análogos das prostaglandinas. Durante anos, a pilocarpina foi utilizada no tratamento do glaucoma, perdendo espaço devido à meia-vida curta, à necessidade de grande número de instilações diárias e aos efeitos colaterais freqüentes (Barsam, 1972; Fellman e Starita, 1990; Shields et al., 1998).

O uso tópico da pilocarpina relaciona-se a alterações graves da superfície ocular conjuntival, podendo causar quadro extremo de penfigóide

cicatricial (Fiore et al., 1987), além de alergia na região palpebral e conjuntival e hipersensibilidade induzida pela toxicidade, cursando com conjuntivite folicular (Jackson, 1993).

1.1.2. Agentes autonômicos adrenérgicos

Há dois tipos de receptores adrenérgicos: α e β , que utilizam como mediadores fisiológicos a epinefrina e a norepinefrina. Os agonistas ou estimulantes adrenérgicos, ou simpaticomiméticos, podem atuar direta ou indiretamente nos receptores α , β ou em ambos (Shields et al., 1998).

1979).

1.1.2.1. Alfa-Agonistas

Os receptores α -adrenérgicos, quando estimulados, produzem midríase e vasoconstrição mediadas pelo receptor α_1 , além de diminuição da produção de humor aquoso pela ativação dos receptores α_2 . (Shields et al., 1998; Costa et al., 2002).

1.1.2.1.2 Brimonidina

A brimonidina é também um agonista do receptor α_2 , que reduz a PIO em 20 a 25%, e deve ser instilado duas a três vezes ao dia. As concentrações disponíveis para instilação são de 0,15% e 0,2% e o pico de sua ação hipotensora ocular é observado duas horas após sua administração (Shields et al., 1998).

Apresenta efeitos colaterais menos freqüentes que a apraclonidina, ocasionando alergia (10 a 15%), redução da pressão arterial (PA) diastólica, boca seca (30%), fadiga, zumbido (16%) e cefaléia (18%), com efeitos

cardiovasculares mínimos. (Toris et al., 1995; Shields et al., 1998; Katz et al., 1999).

A brimonidina é contra-indicada para uso pediátrico por induzir depressão do sistema nervoso central (Carlsen et al., 1999; Bowman et al., 2004).

A brimonidina, mais recente integrante da classe dos alfa-agonistas, apresenta como efeito colateral local a hiperemia ocular, cuja incidência varia de 11,4% a 26,3% (Adkins e Balfour, 1998), além de ardência ou queimação ocular (24%) e alergia ocular (blefarite, blefaroconjuntivite e conjuntivite folicular), cuja incidência varia de 4,2% a 11,5% (Adkins e Balfour, 1998; Katz et al., 1999; Melamed et al., 2000).

1.1.2.2. Beta-bloqueadores

Concentração de BAK (?)

São dois os tipos de receptores β adrenérgicos: β_1 e β_2 . A inibição dos receptores β reduz a PIO por diminuir a produção de humor aquoso em 30 a 50%, ocasionando redução da PIO basal de cerca de 25% durante o pico de ação, duas horas após a instilação, mantendo-se em cerca de 20%. A posologia recomendada é uma a duas instilações diárias (Shields et al., 1998).

As drogas pertencentes a essa classe são denominadas simpatolíticas, antagonistas β -adrenérgicos ou beta-bloqueadores. O mais utilizado é o timolol, mas outros exemplos incluem betaxolol, levobunolol, carteolol e metipranolol. O maleato de timolol 0,5% é a droga padrão, bloqueador não-seletivo dos receptores beta (β_1 e β_2). O betaxolol é o único

beta-bloqueador β_1 seletivo (Zimmerman et al., 1977; Radius et al., 1978; Novak, 1987; Shields et al., 1998).

Os beta-bloqueadores apresentam inúmeros efeitos colaterais sistêmicos, sendo que os mais pronunciados atingem o aparelho cardio-respiratórios (broncoespasmo e bradicardia) e o sistema nervoso central. (Berrospi et al., 1982 ; Reiss et al., 1983).

Reações de toxicidade ocular após o uso de beta-bloqueador são incomuns, porém reações alérgicas e penfigóide cicatricial foram reportados (Tauber et al.,1989; Fiore et al., 1987). Ardência e hiperemia conjuntival frequentemente associados com ceratite puntata e anestesia corneana foram descritos, além de alterações nas camadas do filme lacrimal, com redução da produção lacrimal (McMahon et al., 1979; Van Burskirk, 1979, Weissman et al., 1990), produzindo sinais e sintomas de olho seco, queimação (6 a 9% com timolol, contra 30% com betaxolol) e blefaroconjuntivite alérgica (Weissman et al., 1990).

Os efeitos de alteração da produção lacrimal foram descritos em inúmeros estudos: (Herrerias et al.,1992; Nuzzi et al.,1998; Thygesen et al.,2000). Herrerias et al. (1992) associaram o uso prolongado (acima de 6 meses) de maleato de timolol 0,5% à maior incidência de olho seco, caracterizado por redução dos valores do teste de Schirmer e do teste de rotura do filme lacrimal ("break up test"). Além disso, o mesmo estudo empregou citologia de impressão, que demonstrou redução do número de células caliciformes, justificando sintomas relacionados à ceratoconjuntivite sicca.

Outros estudos sugerem que o timolol induza inflamação crônica na conjuntiva, aumento da proliferação fibroblástica, aumento da densidade de colágeno subepitelial, diminuição do número de células calciformes e metaplasia do epitélio conjuntival (Brandt et al.,1991; Williams et al.,1992; Baudouin et al.,1998; Mietz et al.,2001).

1.1.3. Inibidores da anidrase carbônica

1.1.3.1. Sistêmicos

Os inibidores da anidrase carbônica vêm sendo utilizados no tratamento clínico do glaucoma há mais de 40 anos, inicialmente utilizados apenas na apresentação oral. A dose recomendada de acetazolamida (Diamox®) é de uma cápsula de 125 mg ou 250 mg a cada 6 horas, e a dose máxima recomendada é de 1,0 g ao dia. O pico de ação ocorre 2 horas após a ingestão, com duração de até 6 horas. A acetazolamida tem como mecanismo de ação a inibição da enzima anidrase carbônica no epitélio do corpo ciliar, diminuindo a produção de humor aquoso sem atuar no seu escoamento. Dentre os efeitos colaterais induzidos pela acetazolamida podemos citar a sonolência, acidose metabólica, fadiga, depressão, gosto metálico, gastrite, parestesias, perda de peso, formação de cálculo renal, entre outros (Becker, 1954; Lichter,1981; Joyce et al.,1989).

Os intensos efeitos colaterais sistêmicos dos inibidores da anidrase carbônica motivaram o desenvolvimento de inibidores da anidrase carbônica tópicos.

1.1.3.2. Tópicos

Pertencem ao grupo de inibidores da anidrase carbônica tópicos a brinzolamida, na concentração de 1% e dorzolamida, na concentração de 2%, reduzindo a PIO por diminuírem a produção de humor aquoso. Essas drogas promovem redução da PIO em 25% da pressão basal e seu pico de ação ocorre duas horas após a instilação (Strahlman et al., 1995; Silver, 1996).

Os inibidores tópicos da anidrase carbônica apresentam alguns efeitos colaterais locais, incluindo irritação e ardência ocular à instilação, mais intensa com o uso de dorzolamida 2% (63%) quando comparado a brinzolamida 1% (20%) (Tsukamoto et al., 2005). Há descrição de aumento da espessura corneana secundário ao uso de inibidores tópicos da anidrase carbônica (Cvckovic et al, 2003, 1997). Conjuntivite folicular e edema palpebral foram também descritos com o uso de tais fármacos (Balfour et al., 1997; Cvckovic et al., 2003).

1.1.4 PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas, juntamente com leucotrienos, prostaciclina e tromboxano A₂, fazem parte do grupo dos eicosanóides, que são substâncias derivadas de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido araquidônico (Campbell e Halushka, 1996).

As PGs e seus derivados representam uma abordagem diferente para o tratamento medicamentoso do glaucoma, pois são hormônios locais, ao

contrário dos outros medicamentos utilizados, que são agonistas/antagonistas do sistema autonômico ou inibidores de enzimas que são estranhos ao organismo (Bito, 2001).

Embora o mecanismo preciso para o aumento da drenagem úveo-escleral não esteja totalmente esclarecido, os análogos de PGs parecem ativar a cascata de transdução molecular e aumentar a síntese de metaloproteinases no corpo ciliar (Weinreb et al., 1997). A aplicação tópica da PGF_2 e de seus análogos parece modificar o músculo ciliar, alargando e descomprimindo os espaços preenchidos por tecido conectivo entre os feixes musculares (Nilsson et al., 1989; Tamm et al., 1990) e remodelando a matriz extracelular (Weinreb et al., 1997; Ocklind, 1998; Sagara et al., 1999), aumentando dessa forma o escoamento úveo-escleral em primatas (Gabelt e Kaufman, 1989) e humanos (Toris et al., 1993).

Estas são a única classe de colírios antiglaucomatosos cuja potência hipotensora como monoterapia pode atingir 40% de redução da PIO basal. Sua posologia confortável (uma instilação diária) favorece a fidelidade ao tratamento (Linden et al., 2001).

Em relação a efeitos colaterais sistêmicos, os análogos da PG parecem ser drogas seguras, embora esta observação necessite de confirmação através de resultados de estudos a longo prazo. Podem provocar efeitos adversos leves a moderados incluindo náusea, dor abdominal, tontura, fadiga, ondas de calor, sudorese, ansiedade e cefaléia. (Easthope et al., 2002).

Os análogos da PG podem alterar a coloração do olho, aumentando a quantidade de pigmento da íris, particularmente em pacientes com íris de cor mista, isto é, azul acastanhado, cinza acastanhado, verde acastanhado ou amarelo acastanhado (Alm e Stjernschantz, 1995). Entre os mais sérios efeitos colaterais induzidos pelos análogos da PG estão a quebra da barreira hemato-ocular e o desenvolvimento de edema macular cistóide (EMC) (Ayyala et al., 1998; Lima et al., 2000; Arcieri et al., 2005).

Dentre os efeitos colaterais locais relatados após o uso de análogos de PGs, a hiperemia conjuntival é o mais freqüente, podendo estar presente em até 50% dos usuários, dependendo da droga utilizada (Feldman et al., 2003).

A hiperemia conjuntival secundária ao uso de análogos de PGs, além de provocar desconforto estético, dificulta a aceitação do tratamento. Postula-se que a mesma seja decorrente de processo inflamatório conjuntival, desencadeado pela composição química dos medicamentos ou ainda que seja secundária a uma vasodilatação, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão elucidados. (97

Russ et al. (2007) avaliaram alterações induzidas em conjuntivas de coelhos em análogos de prostaglandinas e maleato de timolol e demonstraram que análogos de prostaglandinas induzem alterações menores no epitélio conjuntival de coelho que maleato de timolol. No grupo tratado com o timolol, houve um aumento significativo da espessura epitelial e um aumento de densidade de colágeno subepitelial. Este achado pode ser secundário ao edema das células epiteliais, ou à presença de um infiltrado

inflamatório, também encontrada em maior intensidade nos olhos tratados com maleato de timolol, e pode explicar em parte a ocorrência de sintomas de olho seco em pacientes utilizando maleato de timolol. Vários estudos demonstraram também que o timolol pode induzir uma redução no número de células caliciformes e um padrão de cristalização associada com queratoconjuntivite sicca (Herreras et al., 1993; Baudouin et al., 1994).

1.1.5 ASSOCIAÇÕES DE DROGAS

Segundo o 3o Consenso da Sociedade Brasileira de Glaucoma, quando uma droga inicialmente prescrita não é capaz de diminuir a PIO em mais de 10%, aconselha-se substituí-la por outra droga que possa apresentar um melhor efeito hipotensor; e quando apresenta efeito hipotensor insuficiente (ainda que maior que 10%), deve-se acrescentar uma segunda droga na prescrição (SBG, 2009). Estima-se que nos Estados Unidos aproximadamente 50% dos pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) necessitam de uma segunda droga nos primeiros dois anos de tratamento (Kobelt-Nguyen et al., 1998). Outros estudos clínicos concluíram que 40% dos hipertensos oculares e 75% dos pacientes glaucomatosos necessitam de duas ou mais medicações para atingir a PIO alvo nos primeiros dois anos de acompanhamento (Lichter et al., 2001).

A associação de drogas hipotensoras oculares deve obedecer a algumas normas básicas que irão determinar o sucesso do tratamento. Como regra geral, a prescrição deve se basear num esquema terapêutico que seja eficaz e que apresente menor complexidade possível para facilitar a

aderência ao tratamento proposto. Dados comprovam que 28% a 55% dos pacientes não seguem adequadamente o regime terapêutico determinado pelo médico (Olthoff et al.,2005). A falta de aderência ao tratamento se constitui em uma das principais causas de falência do tratamento clínico. O uso irregular e esporádico, a descontinuidade de uso e a utilização dos colírios somente nos dias que antecedem o retorno são alguns fatores relacionados à falta de aderência. Esses fatores podem explicar a progressiva perda visual que ocorre em um número significativo dos pacientes sob tratamento. A correta associação de drogas desempenha um papel fundamental para o sucesso do tratamento clínico (Patel et al.,1995)

A combinação de drogas deve apresentar efeito hipotensor clinicamente significativo, e as drogas devem ter, de preferência, mecanismos de ação diferentes com o objetivo de alcançar o efeito sinérgico. Assim, sempre que possível, deve-se associar uma droga que reduza a produção do humor aquoso com outra que aumente o escoamento do humor aquoso. Como exemplo adequado de associação, podemos citar aquela de maleato de timolol – que age diminuindo a produção do humor aquoso – com um dos análogos das prostaglandinas, que age aumentando o escoamento do humor aquoso pela via uveoescleral.

Combinações fixas de drogas em forma de colírio têm sido lançadas no mercado com o intuito de simplificar o tratamento e melhorar a eficácia clínica das drogas hipotensoras oculares (Arcieri et al.,2007).

No Brasil, existem as combinações fixas de: latanoprost + timolol (Xalacom® - PharmaciaPfizer), travoprost + timolol (Duo-Travatan® -Alcon), bimatoprost + timolol (Ganfort® - Allergan), dorzolamida/timolol (Cosopt® - MSD), brinzolamida +timolol (Azorga® - Alcon) e brimonidina/timolol (Combigan® - Allergan). De maneira geral, as diferentes associações fixas existentes no mercado apresentam eficácia estimada entre 30% e 35% (em relação à PIO inicial) e têm sido amplamente utilizadas, algumas vezes sendo prescritas sem a consideração de alguns critérios ou uma devida ponderação dos aspectos positivos e negativos relacionados a essa escolha. Entre os pontos positivos da associação fixa, encontramos a necessidade de um menor número de gotas, melhorando a aderência ao tratamento, a menor quantidade de preservativos utilizada, a diminuição do efeito "washout" da segunda gota instilada e, em alguns casos, um menor custo do tratamento final.

Além dos efeitos colaterais sistêmicos e locais já descritos anteriormente, o uso crônico de medicações tópicas antiglaucomatosas pode causar distúrbios da superfície ocular como alergia, ceratite puntata e olho seco (Shields et al., 1996).

2. AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE OCULAR

Em pacientes tratados com medicação tópica, a conjuntiva age como uma membrana semipermeável que, juntamente com a córnea, permite a absorção das drogas hipotensoras oculares. Por outro lado, a conjuntiva responde às agressões com inflamação, cicatrização, queratinização e neovascularização (Brandt et al., 1991).

2.1. Anatomia Conjuntival

A conjuntiva é formada por duas porções: a bulbar, em contato com o globo e fracamente aderida à cápsula de Tenon, e a palpebral, que recobre as pálpebras e está firmemente aderida ao tarso (Krachmer et al., 1997). Na superfície conjuntival podem-se observar células conjuntivais não-secretoras e secretoras. As células conjuntivais não-secretoras são oriundas do epitélio colunar estratificado. Sua morfologia pode variar conforme sua camada de origem. As células epiteliais secretoras são as células caliciformes, mucossecretoras, que correspondem a 10% das células do epitélio conjuntival. São mais numerosas próximo à conjuntiva tarsal e bulbar inferonasal.

O suprimento sanguíneo da conjuntiva palpebral é o mesmo das pálpebras, ou seja, deriva dos ramos faciais da artéria carótida externa (facial, superficial, temporal e infraorbital) e de ramos da artéria oftálmica (dorsal, nasal, frontal, supra-orbital e lacrimais), derivados da artéria carótida

interna. O suprimento da conjuntiva bulbar deriva das artérias ciliares anteriores, ramos da artéria oftálmica. A inervação sensorial dá-se através dos ramos lacrimal, supra-orbital, supratrocLEAR e infra-orbital, ramos da divisão oftálmica do V par craniano (Krachmer, Mannis e Holland, 1997).

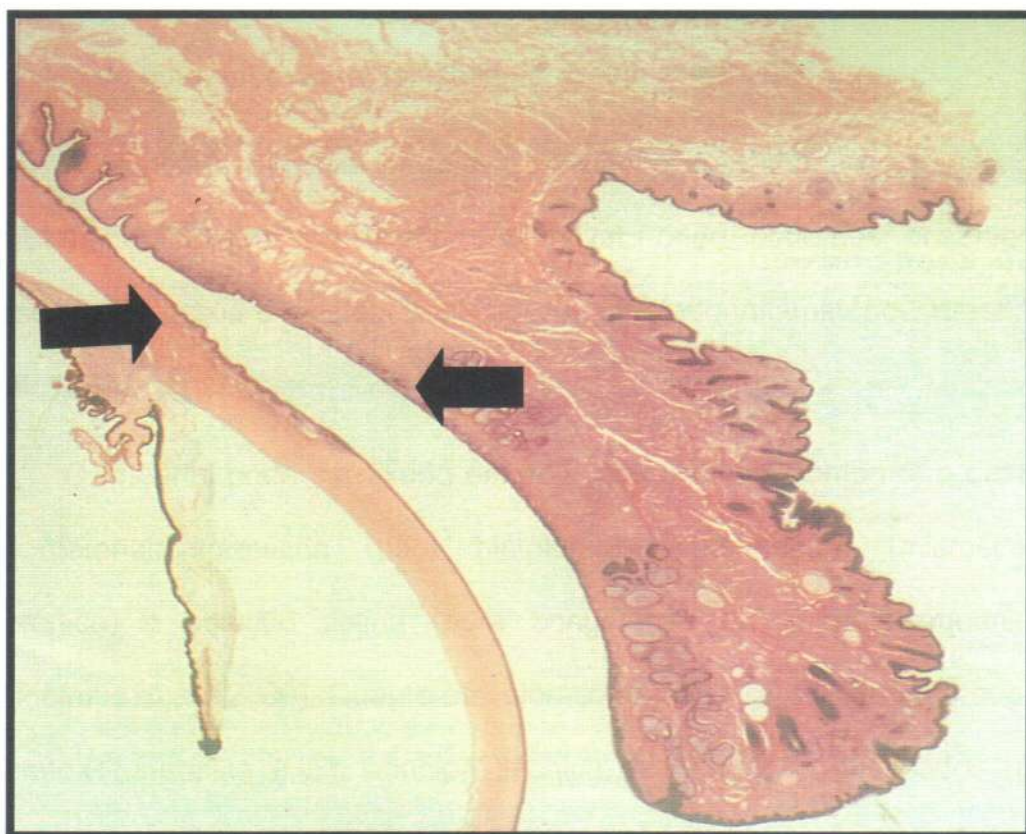


Figura 1: Fotomicrografia com aumento de 400 x demonstrando conjuntiva bulbar (seta à esquerda) e palpebral (seta à direita). Coloração HE. Fonte: Krashmer e Spalton, 1996.

2.2. Técnicas para avaliação da conjuntiva

?

2.2.1. Biópsia conjuntival

Trata-se de procedimento realizado em casos de conjuntivite crônica ou desordens incomuns como penfigóide cicatricial, síndrome oculoglandular de Parinaud, ceratoconjuntivite límbica superior e tumores linfóides conjuntivais. É contra-indicada em pacientes com glaucoma devido à indução de cicatrização e fibrose no local, o que pode comprometer o sucesso de uma futura cirurgia fistulante (Singh et al., 2005).

A biópsia conjuntival permite a avaliação de camadas superficiais e profundas, incluindo o estroma conjuntival, onde podemos observar a presença de vasos e existência ou não de infiltrado inflamatório. (Krashmer et al., 1997).

O material pode ser fixado em soluções distintas conforme o destino do material: formalina (para histologia), glutaraldeído (microscopia eletrônica) e solução salina (para congelação ou imunohistoquímica). (Wilhelmus et al., 2000). Quanto às colorações, pode-se utilizar o método de hematoxilina-eosina (HE), principal técnica de coloração de tecidos para estudo de histologia básica. A hematoxilina é basófila, ou seja, tem afinidade por substâncias básicas. Assim, ela costuma corar o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso, locais onde há grande quantidade de proteínas (básicas pelo seu grupamento amina). A eosina é acidófila, tendo afinidade pelo citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias ácidas das células (Wilhelmus et al., 2000).

A presença de polissacarídeos ou muco pode ser determinada pela técnica do PAS (Periodic Acid-Schiff), que permite identificar polissacarídeos simples ou associados a proteínas (Krachmer et al., 1997).

Retinar

2.2.2. Citologia conjuntival ou esfregaço conjuntival

Para obtenção do material destinado à citologia conjuntival, utiliza-se a espátula de Kimura ou utiliza-se uma pequena escova ("citobrush"). Após a coleta do material, este é imediatamente disposto sobre uma lâmina de vidro ou colocado em solução tamponada contendo papel filtro, que absorverá as células sobrenadantes. A fixação é feita rapidamente para evitar ressecamento do material e, empregando-se colorações como GIEMSA ou PAS, é possível observar células calciformes e um grande número de células epiteliais queratinizadas e também desorganizadas, pois o raspado quebra as junções celulares existentes no epitélio. Restos celulares e muco também podem ser observados (Scarpi, 1996; Tseng, 1985).

2.2.3. Citologia de impressão

A citologia de impressão utiliza o acetato de celulose (papel filtro) para colheita de material, posicionando a face rugosa do filtro milipore sobre a conjuntiva, que é pressionada com um bastão de vidro por alguns segundos (Tseng, 1985; Kraschmer et al., 1997).

Para detectar alterações celulares como queratinização e aumento na estratificação celular e avaliar a densidade de células calciformes, utilizam-se as mesmas colorações utilizadas na biópsia conjuntival: hematoxilina –

eosina e PAS (Scarpi,1996). Este procedimento pode ser considerado uma biópsia não-invasiva, possibilitando mapear alterações topográficas celulares e anormalidades de superfície conjuntival (Tseng, 1985; Singh et al., 2005).

2.3. CONSEQUÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES CONJUNTIVAS SOBRE O SUCESSO DA CIRURGIA FISTULANTE

Há evidências crescentes de que as medicações antiglaucomatosas tópicas afetam adversamente a superfície ocular e influenciam negativamente o resultado da cirurgia fistulante (Addicks et al., 1983; Lavin et al.,1990; Brandt et al., 1991; Prata Junior e Reis, 1993; Baudouin et al., 1994). Sugere-se que uma reação inflamatória conjuntival crônica induzida pelas medicações exacerbaria o processo cicatricial, fato pouco desejável após a realização de uma cirurgia fistulante.

Lavin (1990), em estudo retrospectivo com 47 pacientes submetidos a trabeculectomia, comparou a taxa de sucesso da cirurgia em pacientes tratados com colírios por tempo curto antes da cirurgia (menos de duas semanas) com pacientes tratados por mais de um ano com terapia múltipla. A taxa de insucesso foi significativamente maior no grupo submetido a tratamento múltiplo (20,9%) ($p=0,001$) do que no grupo tratado por menos de duas semanas (2%). A falência ocorreu em média três meses após o procedimento, e o período de seguimento médio foi 27 meses em ambos os grupos.

Prata Junior e Reis (1993), em análise retrospectiva de 284 trabeculectomias realizadas em pacientes com glaucomas primários,

analisaram o sucesso da cirurgia fistulante em pacientes usuários crônicos de medicação antiglaucomatosa tópica (média de $26,5 \pm 20$ meses) comparado a pacientes virgens de tratamento. Constataram maior taxa de sucesso (96,3%) no grupo que não foi tratado anteriormente do que no grupo submetido a tratamento tópico prolongado (83,9%), com diferença estatisticamente significativa, sugerindo que o uso de medicações pode predispor ao insucesso da cirurgia.

Broadway (1994) avaliou 124 pacientes submetidos a trabeculectomia seguidos por pelo menos seis meses. Os pacientes foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento anterior: grupo A (sem medicação ou usuários de colírios por período menor que seis meses), grupo B (beta-bloqueador), grupo C (beta-bloqueador associado a miótico) e, grupo D (beta-bloqueadores, mióticos e simpaticomiméticos). A taxa de sucesso do grupo de usuários de beta-bloqueadores (93%) foi similar ao grupo que usou medicação por tempo curto (90%), e maior que as taxas de sucesso do grupo beta-bloqueador + mióticos (72%) e dos usuários de três medicações (beta-bloqueador, miótico e simpaticomimético) (45%). O autor concluiu que o uso prolongado de medicações antiglaucomatosas tópicas constitui fator de risco para falência de trabeculectomia.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios com pacientes glaucomatosos que receberam tratamento medicamentoso tópico mostraram que tanto os agentes hipotensivos quanto seu conservante (cloreto de benzalcônio) causam aumento do número de células inflamatórias e fibroblastos na substância própria da conjuntiva e reduzem o número de células caliciformes, induzindo alterações da superfície ocular como olho seco. A duração do tratamento e a quantidade de medicação administrada estão relacionadas com a gravidade dos efeitos colaterais. Além disso, existem evidências crescentes sugerindo que estas alterações podem aumentar o risco de falência da trabeculectomia. Entretanto, grande parte da informação neste tópico foi publicada antes do advento dos análogos de prostaglandinas.

Devido ao uso crescente dos análogos das prostaglandinas e suas associações e à escassez de estudos que avaliem as alterações conjuntivais induzidas pelos mesmos, devido à necessidade de esclarecimento dos mecanismos envolvidos na gênese da hiperemia conjuntival induzida por essas medicações, houve interesse em desenvolver o presente estudo, que visa estudar as alterações conjuntivais induzidas por análogos das prostaglandinas (latanoprost 0,005%, bimatoprost 0,03% e travoprost 0,004%) associados ao maleato de timolol 0,5%.

4. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar a reação inflamatória na conjuntiva de coelhos submetidos a tratamento ocular tópico com latanoprostá 0,005%, bimatoprostá 0,03%, travoprostá 0,004% associados ao maleato de timolol 0,5%.
2. Avaliar a quantidade de células calciformes na conjuntiva de coelhos submetidos ao tratamento ocular tópico com latanoprostá 0,005%, bimatoprostá 0,03%, travoprostá 0,004% associados ao maleato de timolol 0,5%.
3. Avaliar o epitélio da conjuntiva de coelhos submetidos ao tratamento ocular tópico com latanoprostá 0,005%, bimatoprostá 0,03%, travoprostá 0,004% associados ao maleato de timolol 0,5%.
4. Avaliar a eficácia através dos parâmetros: fibrose, números de vasos reativos ao processo inflamatório, grau de infiltrado inflamatório, espessura epitelial) no controle da inflamação pós-operatória da trabeculectomia em coelhos submetidos previamente a tratamento ocular tópico com bimatoprostá 0,03%, da prednisolona 1%, da ciclosporina 0,01% e da associação de ambas.

*Faltou
a Imunohisto
química*

9

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental em animais, randomizado, mascarado, no período de novembro 2008 a outubro de 2009, foi realizado pelo grupo de Oftalmologia Comparada da UFPR, associação criada para desenvolvimento de trabalhos de pesquisas de nível extensão universitária, mestrado e doutorado, possuindo padrões validados de acordo com as condições técnicas nacionais e internacionais, sendo registrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Foram incluídos sessenta coelhos albinos da raça Nova Zelândia (*oryctolagus cuniculus*). O estudo foi realizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo no 038/2008), seguindo as normas para uso de animais em pesquisa estabelecidas pela *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO).

Os animais foram mantidos no biotério dessa instituição em viveiro padrão para coelhos, ou seja, acomodados em gaiolas (dez coelhos por gaiola), alimentados com uma dieta regular sem restrições em relação à quantidade de comida ou água consumidas. A temperatura ambiente era de aproximadamente 20° (18 a 23°) e os animais foram mantidos sob ciclo controlado de 12 horas em ambiente claro sob iluminação de lâmpadas fluorescentes e 12 horas em ambiente escuro.

5.1. Critérios de inclusão

Incluíram-se no estudo apenas animais do sexo feminino com idade em torno de 90 dias e peso entre 1750g e 2300g, saudáveis e sem alterações oculares detectáveis ao exame externo. Todos os animais foram vacinados previamente com um acaricida e endoparasiticida denominado Ivomec® (0,5 ml) (Ivermectina, Merial Brasil, Campinas, São Paulo, Brasil) e tomaram complemento vitamínico ADE (0,5 ml) (Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil), segundo as normas do biotério.

5.2. Critérios de exclusão

Retiram

Foram excluídos animais de sexo masculino e com idade acima de 90 dias e com peso fora da faixa estabelecida. Os animais portadores de doenças sistêmicas e/ou oculares foram excluídos do estudo.

5.3. Constituição dos grupos

Os grupos foram constituídos aleatoriamente, por tabela de aleatoriedade do Windows Excel®, alocando populações de 10 animais em cada grupo. O olho esquerdo de cada animal recebeu diariamente, durante trinta dias, uma gota de colírio da combinação fixa de maleato de timolol 0,5% associado a um análogo de prostaglandina. A instilação da associação foi realizada às 17 horas, tempo que antecedia o início do ciclo noturno dos animais.

O grupo 1 recebeu a combinação fixa de maleato de timolol 0,5% e bimatoprost 0,03% (Ganfort® - Allergan); o grupo 2, a combinação fixa de maleato de timolol 0,5% e travoprost 0,004% (Duo-Travatan® - Alcon) e o

grupo 3, a combinação fixa de maleato de timolol 0,5% e latanoprost 0,005% (Xalacom® - PharmaciaPfizer), constituindo os grupos que seriam analisados os aspectos inflamatórios da conjuntiva pós uso de combinações fixas.

Para a análise dos protocolos com ciclosporina 0,05% (Restasis®), prednisolona 1% (Predfort®) e da associação de ambas no pós-operatório de trabeculectomia, os grupos 4, 5 e 6 receberam colírio de bimatoprost 0,03% (Lumigan® - Allergan). Os olhos direitos serviram como controle e não receberam nenhuma medicação.

Todas as medicações testadas foram instiladas na posologia de uma gota ao dia por 30 dias às 17 horas.

5.4. MÉTODOS

Com o objetivo de avaliar alterações histológicas iniciais, após um período de trinta dias de tratamento, nos grupos 1, 2 e 3 os coelhos foram submetidos a eutanásia e subsequente enucleação bilateral.

Os grupos 4, 5 e 6 foram submetidos a trabeculectomia (TREC) sem antimetabólitos, em todos os animais, por um mesmo cirurgião (HR), que não participou da leitura dos parâmetros avaliados. Os animais foram divididos aleatoriamente (tabela de aleatoriedade Windows Excel®) em três grupos de dez animais. Os três protocolos de pós-operatório, durante sete (07) dias, eram: acetato de prednisolona 1%, quatro vezes ao dia (grupo 1), ciclosporina 0,05%, duas vezes ao dia (grupo 2) ou associação de acetato de prednisolona 1% quatro vezes ao dia com ciclosporina 0,05% duas vezes ao dia (grupo 3). Todos os grupos receberam antibioticoterapia com colírio

de gatifloxacina 0,03% (Zymar®), quatro vezes ao dia. Após uma semana, os animais foram submetidos à eutanásia .

Os olhos, após a eutanásia, foram imediatamente fixados com formaldeído 10%, durante 24 horas. Após a fixação os olhos foram seccionados e passaram por processamento padrão de desidratação com álcool de graduação crescente, até álcool absoluto 90%, aclaração com xilol e posterior inclusão em parafina (Bacha Jr. e Wood, 1991). Os cortes do bloco parafinado realizados com micrótomo foram então corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schif (PAS) e submetidos à imunistoquímica com os seguintes marcadores: anti-fator VIII (Sigma, St. Louis, MO, diluição 1:100), anti-actina de músculo liso (ICN Biochemicals, diluição 1:10) e anti-interleucina 6 (no grupos 4,5 e 6).

Nas lâminas empregadas para avaliação e quantificação de processo inflamatório, contagem de número de vasos, medida do diâmetro vascular e espessura do epitélio, utilizou-se a coloração de HE com um aumento de 400 vezes. A coloração de PAS foi empregada para avaliação das células calciformes.

5. 4.1. Avaliação histomorfométrica e imunistoquímica

Para a análise histomorfométrica (HE e PAS), os olhos de cada animal depois da fixação foram avaliados macroscopicamente, dividindo os globos oculares em duas metades iguais (lateral e medial). As duas metades foram submetidas à desidratação, diafanização e impregnação em parafina com histotécnico marca Leica®, modelo TP 1020. Para a confecção dos blocos de parafina utilizou-se o inclusor Leica®, modelo EG1160. Estes

blocos foram cortados com micrótomo, marca Leica[®] modelo RM2145, a 5 μ para obtenção dos cortes histológicos. Estes cortes foram pescados em lâmina de vidro com albumina, corados com hematoxilina-eosina e PAS, montados com lamínula de vidro de 24x90 mm Entellan, Merck[®].

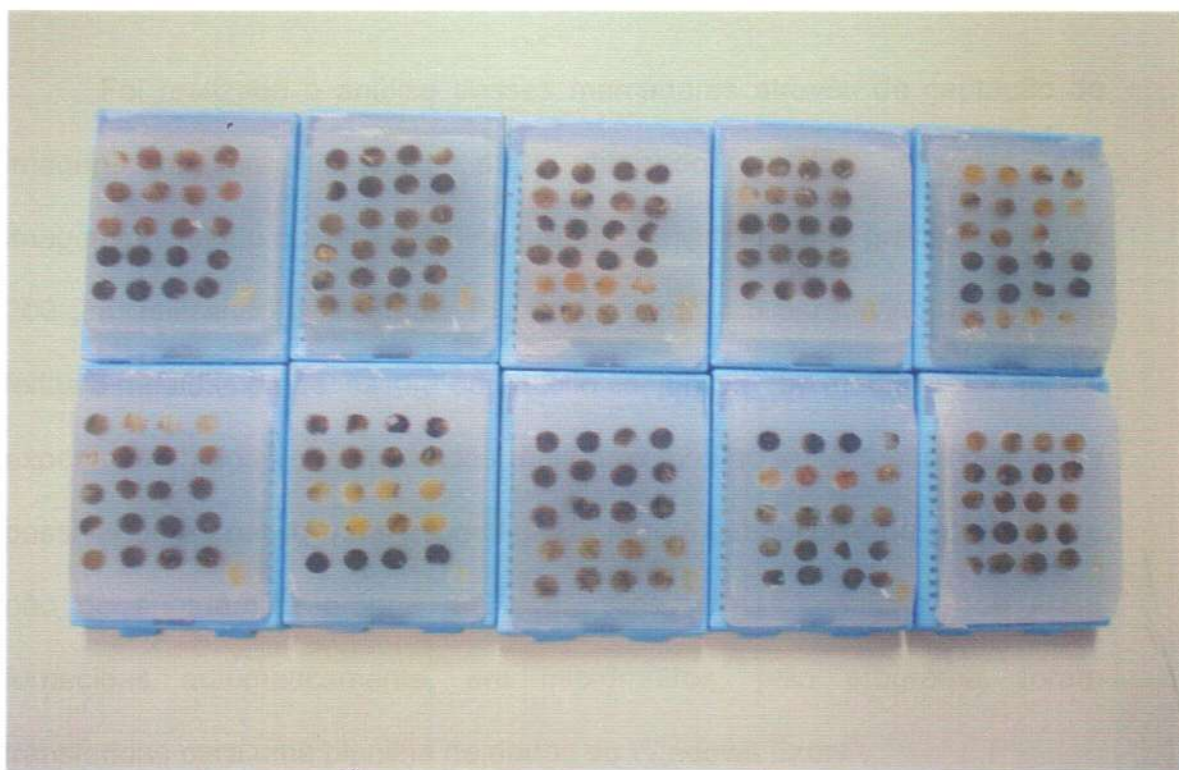
As lâminas coradas em hematoxilina-eosina foram analisadas sob o ponto de vista morfológico qualitativo, sendo que foram selecionados 60 cortes histológicos, um para cada animal do estudo, com qualidade técnica adequada para a realização da análise quantitativa.

Para a análise quantitativa, os cortes corados em hematoxilina-eosina previamente selecionados foram avaliados, e com a ajuda da objetiva de 4x e uma caneta de retroprojeção azul, foi então feita a captura de uma imagem por segmento (total de 10 imagens capturadas em cada olho) através de microscópio Olympus BX50 acoplado a câmera Sony (P100, Sony Brasil, Manaus, Brasil) e software Image Proplus 4.5[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Em cada imagem capturada foram realizadas 4 medidas morfométricas lineares, de epitélio conjuntival de 200 μ m de comprimento e 5 μ m de espessura, utilizando-se o software Image Proplus[®] (40 medidas em cada um dos olhos) para avaliar os parâmetros propostos.

A medida de segmentos lineares de mesmo tamanho permitiu a mensuração dos seguintes parâmetros: diâmetro dos vasos sanguíneos, número de células caliciformes e inflamatórias e espessura do epitélio

conjuntival, que foram mensurados usando ferramentas virtuais do programa.

A avaliação imunoistoquímica foi realizada através da técnica do tissue microarray (TMA) artesanal, em que amostras de todos os casos foram incluídas em blocos multiamostrais de parafina, sendo que os casos têm sua identificação controlada por um mapa do tipo plano cartesiano (figura 2).



(9) Figura 2 - "Tissuê Microarray (TMA) do estudo"

Lâminas do bloco especial de TMA foram cortadas para a realização da imunohistoquímica sendo submetidas ao processo pela técnica da imunoperoxidase. Foi realizada a desparafinização com xilol quente (37°C), a desidratação com banhos sucessivos de álcool e a

rehidratação com água, em lâminas de conjuntiva que foram selecionados como controle dos anticorpos primários a serem testados. Todos os casos foram corados em duplicata, utilizando-se uma lâmina como controle negativo do mesmo tecido. Utilizou-se o álcool metílico e H₂O para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H₂O para o segundo bloqueio. Procedeu-se com a incubação com os anticorpos primários padronizado para este estudo, com os seguintes marcadores:

Anti-fator VIII (Sigma, St. Louis, MO, diluição 1:100)

Anti-actina de músculo liso (ICN Biochemicals, diluição 1:10)

Anti-interleucina 6 (AdbSerotec, diluição 1:10)

Foi realizada a análise desses marcadores através da captação de imagens com magnificação de 400x, utilizando o mesmo *software*. Cada imagem, incluindo epitélio e lâmina própria, foi virtualmente gradeada (150 X 200 µm) utilizando o programa Pro Image-plus[®] 4.5 para Windows[®], foram feitas 5 medidas da espessura da epitélio conjuntival (50 medidas por animal experimental), dos três subcampos mais próximos ao epitélio para que fosse possível uma análise mais específica da região subepitelial da conjuntiva e não de sua lâmina própria em cada slide. Essas medidas, que eram fornecidas automaticamente, em micrômetros, pelo programa, foram transferidas para uma planilha de dados do Windows Excel[®].

Os responsáveis pela leitura das lâminas (NVF e PR) não tiveram conhecimento sobre as identificações dos grupos. Foram realizadas duas(02) medidas dos parâmetros por cada examinador e em seguida confirmada pelo segundo, para então estabelecer a concordância dos

valores encontrados e realizadas a média dos parâmetros, conforme padrão descrito por Russ et al. (2007), único estudo brasileiro que descreve estas medidas e reproduz as mesmas condições.

5.5. Análise estatística

Para as variáveis numéricas oriundas da análise histomorfométrica (número de células inflamatórias, espessura epitelial, número de células calciformes) o teste One-Way ANOVA foi aplicado seguido por teste *post hoc* de Tukey-Kramer. Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

Para as variáveis oriundas da análise imunoistoquímica, como a avaliação qualitativa do grau de fibrose, empregou-se o Teste Exato de Fisher. Utilizou-se o programa StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) para o processamento dos testes estatísticos.

6- Artigo 01

Alterações conjuntivais induzidas por combinações fixas de análogos de prostaglandinas e maleato de timolol: aspectos inflamatórios.

Núbia Vanessa Lima de Faria, Palloma Rose, Paulo Augusto Mello, Lúcia Noronha, Fabiano Montiani-Ferreira, Heloisa Helena Russ, Sebastião Cronemberger

RESUMO

OBJETIVO: Comparar as alterações histológicas e imunoistoquímicas induzidas por combinações fixas de maleato de timolol e análogos de prostaglandinas na conjuntiva de coelhos. **MÉTODOS:** Trinta olhos esquerdos de coelhos, divididos em três grupos, foram tratados durante trinta dias com as seguintes associações de drogas: bimatoprost 0,03% + timolol 0,5%, travoprost 0,004% + timolol 0,5% e latanoprost 0,005% + timolol 0,5%. Os olhos direitos serviram como controle e não receberam nenhuma medicação. Ao final do experimento, após a enucleação, as conjuntivas foram avaliadas através de histomorfometria (número de células inflamatórias e calciformes, espessura epitelial), e imunohistoquímica (anticorpo anti-actina para avaliar o grau de fibrose). **RESULTADOS:** Histomorfometricamente, verificou-se infiltrado de células inflamatórias em todos os olhos tratados. Um aumento no número de células calciformes foi observado com o uso de todas as combinações fixas de análogos de prostaglandinas associados a maleato de timolol em comparação com o

grupo controle. Todos os olhos (tratados e controles) demonstraram algum grau de marcação pela anti-actina (grau de fibrose). Nos olhos controle esse grau variou de mínimo a leve. Nos olhos tratados com travoprostá+timolol foi observado maior grau de fibrose (mediana 3), seguido pelo grupo bimatoprostá+timolol (mediana 2.5) e em seguida pelo grupo latanoprostá+timolol (mediana 2). Essas diferenças, apesar de mostrarem uma tendência numérica, não foram significativas. A combinação travoprostá+timolol provocou fibrose mais intensa. O uso da bimatoprostá+timolol provocou um padrão de reação intermediário entre as outras drogas, causando um maior aumento do número de células caliciformes no epitélio conjuntival do que as outras combinações fixas. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação do número de células caliciformes dos olhos tratados com bimatoprostá+timolol ($16,11 \pm 2,42$) e os tratados com latanoprostá+timolol ($13,18 \pm 1,60$) ($p=0,016$).

CONCLUSÃO: Verificou-se que todas as combinações fixas de análogos de prostaglandinas + timolol causam reação na conjuntiva, aumentando o infiltrado inflamatório.

Palavras-chave: glaucoma, combinações fixas, conjuntiva, inflamação, histologia, imunoistoquímica

ABSTRACT

OBJECTIVE: To compare the histological and immunohistochemical changes induced by fixed combinations of timolol maleate and prostaglandin analogues in the rabbit conjunctiva. **METHODS:** Thirty left eyes of rabbits, divided into three groups, were treated for thirty days with the following combinations of drugs: bimatoprost 0.03% + timolol 0.5%, travoprost 0.004% + timolol 0.5% and latanoprost 0.005 + timolol 0.5%. The right eyes served as controls and received no medication. At the end of the experiment, after enucleation, the conjunctivas were assessed through histomorphometry (number of inflammatory and goblet cells, epithelial thickness) and immunohistochemistry (anti-actin antibody to assess the degree of fibrosis). **RESULTS:** Histomorphometrically, there was infiltration of inflammatory cells in all the treated eyes. An increased number of goblet cells was observed with the use of all fixed combinations of prostaglandin analogues associated with timolol maleate in comparison with the control group. The combination travoprost + timolol resulted in more intense fibrosis. The effect of bimatoprost + timolol caused an intermediate reaction pattern among the other drugs, fostering a higher numbers of goblet cells in the conjunctival epithelium, more than the other fixed combinations. There was a statistically significant difference in the comparison of the number of goblet cells of eyes treated with bimatoprost + timolol (16.11 ± 2.42) and of those treated with latanoprost + timolol (13.18 ± 1.60) ($P = 0.016$).

CONCLUSION: It was found that all fixed combinations of prostaglandins analogues + timolol induce reaction in the conjunctiva, increasing the inflammatory infiltrate.

Keywords: glaucoma, fixed combination, conjunctiva, inflammation, histology, immunohistochemistry

Introdução

Glaucoma é uma neuropatia óptica, progressiva, crônica, multifatorial e frequentemente associada ao aumento da pressão ocular (PIO) e que requer tratamento a longo prazo com medicação tópica hipotensora (Quigley, 1998). Muitas classes de drogas estão atualmente disponíveis para tratar o glaucoma, incluindo agentes colinérgicos, beta-bloqueadores, agonistas alfa adrenérgicos, inibidores da anidrase carbônica, e mais recentemente os análogos de prostaglandinas (PG), bem como, as combinações fixas (FC) de agonistas alfa adrenérgicos, inibidores de anidrase carbônica ou análogos de prostaglandinas associados a maleato de timolol 0,5% (Souza Filho et al., 2003). Análogos de PG aumentam o fluxo uveoscleral e podem reduzir a pressão intra-ocular em até 40% do seu valor inicial. (Brubaker, 2001; Parrish et al., 2003; Linden et al., 2001). Efeitos sistêmicos secundários induzidos por análogos de PG tópicos são raros. São relatados como efeitos secundários locais causadas por essas drogas: hiperemia conjuntival que pode ser vista em 40% dos pacientes (Leal et al., 2004), o dobro da encontrada nos pacientes usuários de timolol (Jaanus, 1997), além de hiperpigmentação de íris, hiperpigmentação periorbicular, crescimento excessivo dos cílios (Kook and Lee, 2000; Pfeiffer et al., 2001; Alm et al., 2008).

Nos pacientes tratados com medicação tópica, a conjuntiva age como uma membrana semi-permeável que, juntamente com a córnea, permite a absorção de hipotensores oculares (Broadway et al., 1994). Por outro lado, a conjuntiva responde ao tratamento crônico de drogas antiglaucomatosas

com: inflamação, cicatrização, queratinização e neovascularização, que podem afetar diretamente a sua arquitetura e função (Brandt et al., 1991).

Alguns estudos têm revelado que as principais medicações tópicas utilizadas no tratamento do glaucoma aumentam o número de fibroblastos e células inflamatórias na substância própria da conjuntiva e induzem a metaplasia epitelial, ocasionando mudanças na sua estrutura. Altas concentrações de macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos, além de redução na densidade de células caliciformes na conjuntiva foram alterações referidas em pacientes em tratamento crônico com beta-bloqueadores (Baudouin et al., 1999). Estas alterações celulares podem causar instabilidade do filme lacrimal, deixando a córnea e a conjuntiva mais expostas a agentes externos (Pisella et al., 2004).

Alguns trabalhos descrevem as alterações conjuntivais relacionadas ao uso das drogas antiglaucomatosas tópicas mais antigas, porém, pouco se sabe a respeito dos efeitos conjuntivais das novas gerações de colírios, principalmente dos análogos de prostaglandinas (Baudouin et al., 2008). A maioria das pesquisas foi realizada com a latanoprost, o análogo de prostaglandina disponível há mais tempo no mercado, porém informações sobre os efeitos de outros análogos mais recentes, como a bimatoprost e a travoprost, ainda são insuficientes (Parrish et al., 2003; Russ et al., 2007).

A presente investigação buscou avaliar as alterações estruturais e inflamatórias induzidas pelas combinações fixas de análogos de prostaglandinas (latanoprost, travoprost e bimatoprost) e maleato de

timolol.

Materiais e Métodos

Trinta coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, com idade de 4 meses e peso de 1.5kg, foram divididos em três grupos de dez. O olho esquerdo de cada animal recebeu diariamente, durante trinta dias, uma gota de colírio da combinação fixa de maleato de timolol 0,5% associado a um dos seguintes análogos de prostaglandina. O grupo 1 recebeu bimatoprost 0,03%; o grupo 2, travoprost 0.004% e o grupo 3, latanoprost 0.005%. Os olhos direitos serviram como controle e não receberam nenhuma medicação. Após trinta dias, todos os coelhos foram submetidos a eutanásia e subsequente enucleação bilateral. Os olhos foram imediatamente fixados com formaldeído a 10%, durante 24 horas. Após a fixação, os olhos foram seccionados e passaram por processamento padrão de desidratação com álcool de graduação crescente, até álcool absoluto 100%, aclaração com xilol e posterior inclusão em parafina (Bacha Jr. e Wood, 1991). Os cortes do bloco parafinado realizados com micrótomo foram então corados com hematoxilina-eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) e submetidos à imunohistoquímica (IHQ) com o seguinte marcador: anti-actina (ICN Biochemicals, diluição 1:10) As lâminas de HE, PAS, anti-actina foram fotografadas sob magnificação de 400x e analisadas com o *software* Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Foram selecionados dois pontos de cada lâmina, correspondentes à conjuntiva bulbar mais próxima ao limbo (Figura 3).

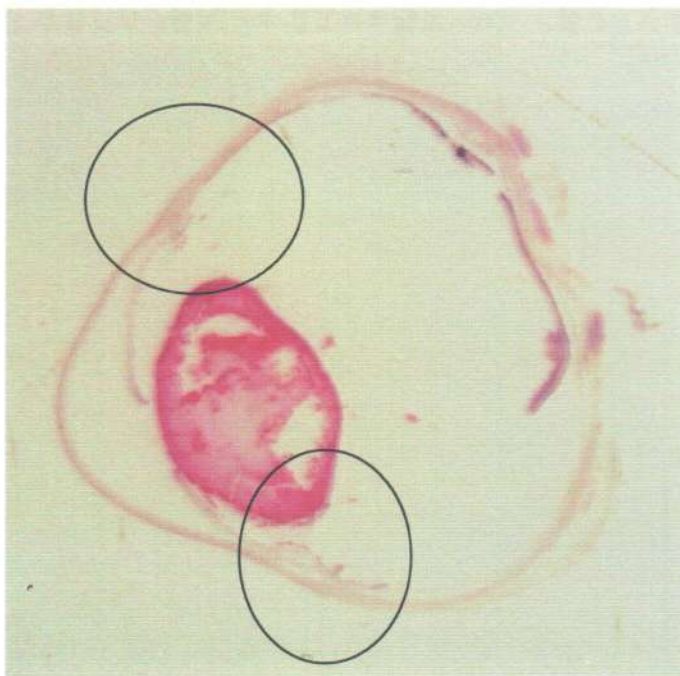


Figure 3— Fotografia de lâmina histológica corada com HE, evidenciando as duas áreas de conjuntiva bulbar próximas ao limbo ventral e dorsal (círculos), que foram avaliadas microscopicamente

Cada imagem, incluindo epitélio, lâmina própria, foi virtualmente gradeada (150 X 200 μm) e os três subcampos mais próximos ao epitélio foram então avaliados para que fosse possível uma análise mais específica da região subepitelial da conjuntiva e não de sua lâmina própria em cada slide (Figura 4).

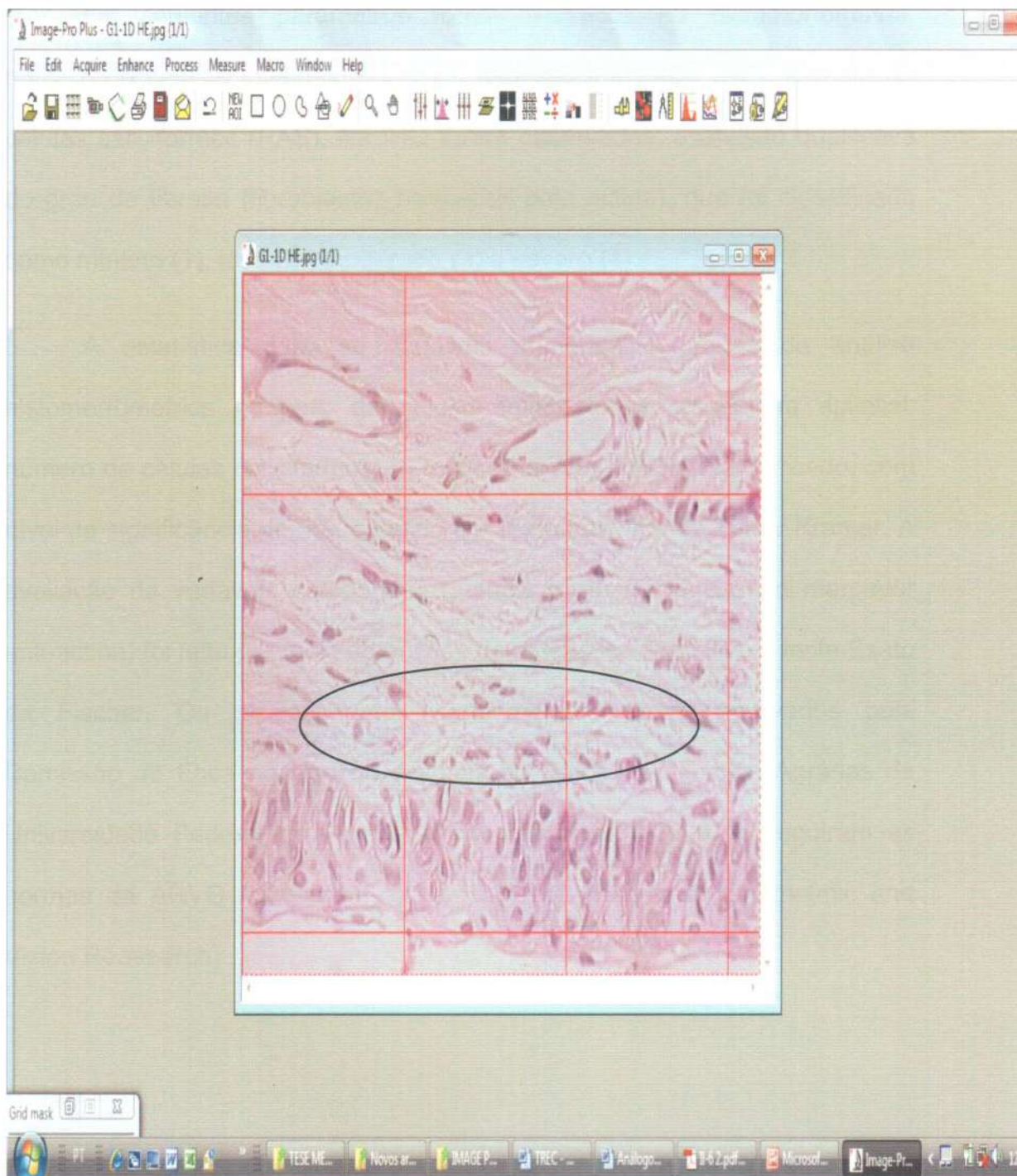


Figura 4 - Interface do programa Image Pro-Plus 4.5, mostrando uma avaliação de lâmina por gradeamento (para mensuração dos parâmetros foram selecionados os três quadrantes mais próximos ao epitélio conjuntival, indicados pela elipse).

Os seguintes parâmetros foram avaliados na histomorfometria: número de células inflamatórias (HE), espessura epitelial (HE), número de células caliciformes (PAS). Na IHQ foram observados: avaliação qualitativa do grau de fibrose (fibroblastos marcados pela actina), que foi classificado como mínimo (1), leve (2), moderado (3) e severo (4).

A estatística para as variáveis numéricas oriundas da análise histomorfométrica (número de células inflamatórias, espessura epitelial, número de células caliciformes) o teste One-Way ANOVA foi aplicado, com nível de significância de 5%, seguido por teste *post hoc* de Tukey-Kramer. A avaliação de variáveis categóricas ordinais (grau de fibrose no marcador anti-actina) foi feita por meio de análise de estatística descritiva e teste Exato de Fischer. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo no 038/2008) e seguiram as normas da ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research).

Resultados

Observou-se aumento no número de células inflamatórias (monomorfonucleares) conjuntivais em todos os grupos, quando compararam-se olhos controle com olhos tratados. Analisando os olhos tratados entre os grupos não houve diferença significativa (Tabela 1, Figura 5).

serviço padrão muito alto 43

Parâmetro	Bimatoprost+Timolol			Travoprost+Timolol			Latanoprost+Timolol							
	Sem tratamento		P	Tratados		P	Sem tratamento		P					
	Média	□SD		Média	□SD		Média	□SD						
Células Inflamatórias (campo)	17,44	5,03	0,0003	34,4	10,12	0,0003	33,33	60,26	18,54	30,64	0,0001	30,72	50,97	0,0001
Espessura Epitelial (µm)	19,56	1,97	0,0305	22,24	30,02	0,0305	23,88	30,94	19,44	20,83	0,0032	26,55	40,75	0,0004
Células Caliciformes (campo)	80,6	1,17	0,0001	16,11	20,42	0,0001	14,44	10,42	70,9	10,37	0,0001	13,18	10,6	0,0001

80(?)

Tabela-1 Resultados dos parâmetros : células inflamatórias; espessura epitelial; células caliciformes dos três grupos de análogos de prostaglandinas+ timolol, comparando olhos controle e olhos tratados, após 30 dias de tratamento. Todos os valores estão apresentados como número médio por campo de magnificação de 400x

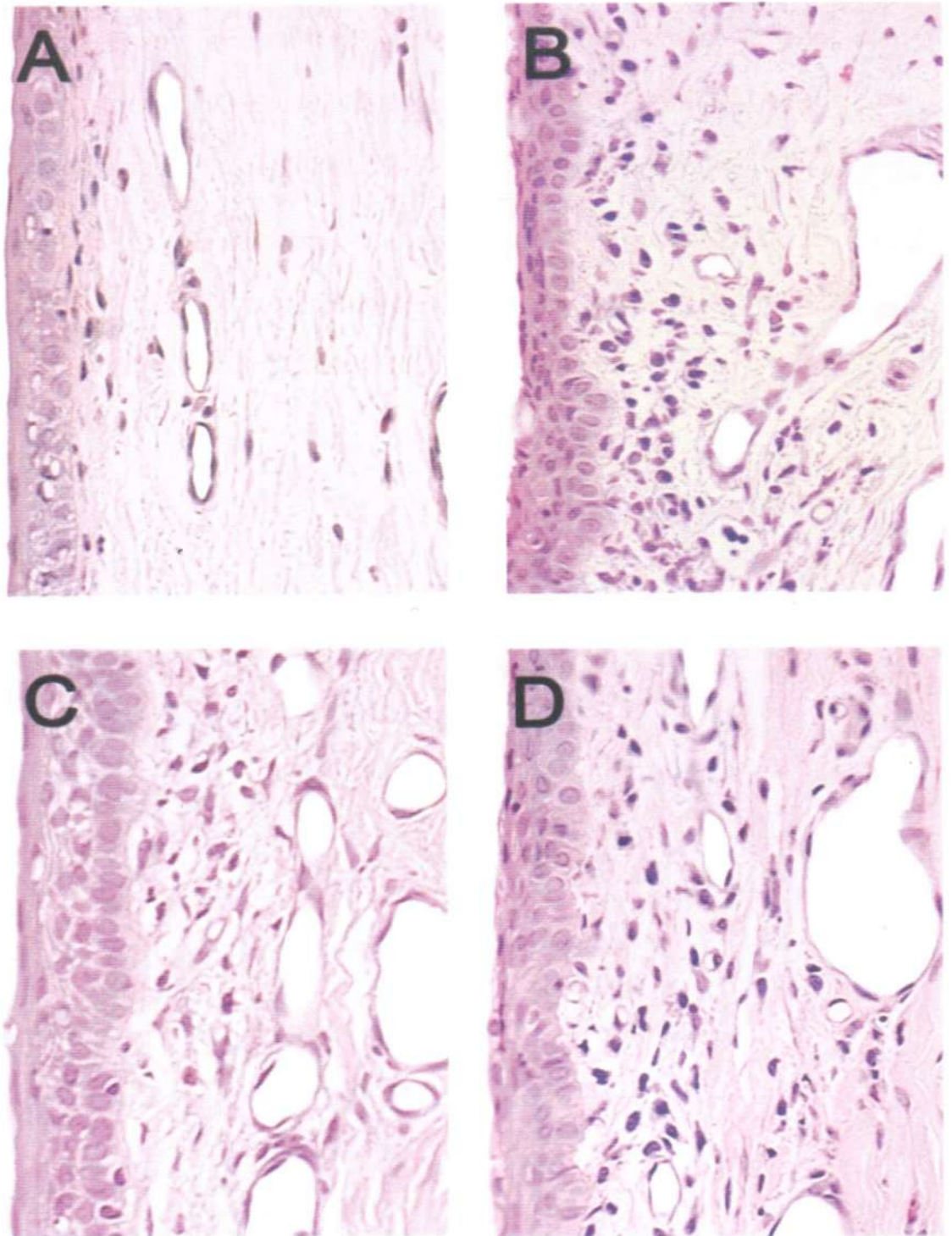


Figura 5 – Fotomicrografias de conjuntivas (magnificação de 400x) coradas com HE, evidenciando o aumento do número de células inflamatórias nos olhos tratados com bimatoprost+timolol (B), travoprost+timolol (C) e latanoprost+timolol (D), em relação ao olho sem tratamento (A)



A espessura epitelial conjuntival aumentou em todos os olhos tratados. Esse aumento foi mais intenso no grupo tratado com latanoprost+timolol ($19,44 \pm 2,83$ para $26,55 \pm 4,75$) ($p=0,0004$), seguido do de travoprost +timolol ($18,74 \pm 2,08$ para $23,88 \pm 3,94$) ($p=0,0032$) e por último, do de bimatoprost+timolol ($19,56 \pm 1,97$ para $22,24 \pm 3,02$) ($p=0,0305$). Quando comparado os três grupos, a diferença entre eles, não foi estatisticamente significativa (Gráfico 1 e Figura 6).

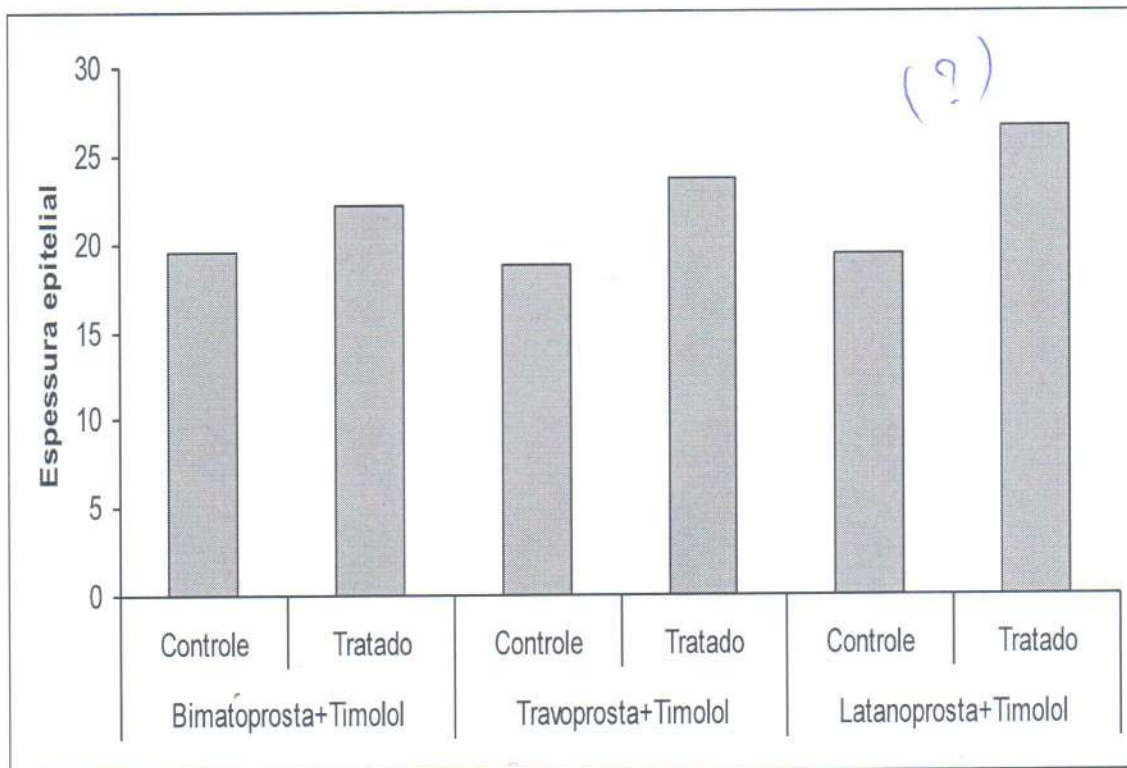


Gráfico 1 – Espessura epitelial da conjuntiva de coelhos, comparando os olhos controle aos tratados, entre os três grupos de tratamento: bimatoprosta+timolol (G1), travoprosta+timolol (G2) e latanoprosta+timolol (G3). Note o aumento na espessura epitelial, com significância estatística, em todos os grupos tratados em relação aos seus respectivos controles. Avaliação histológica realizada com HE. (*) significância estatística $p < 0,05$.

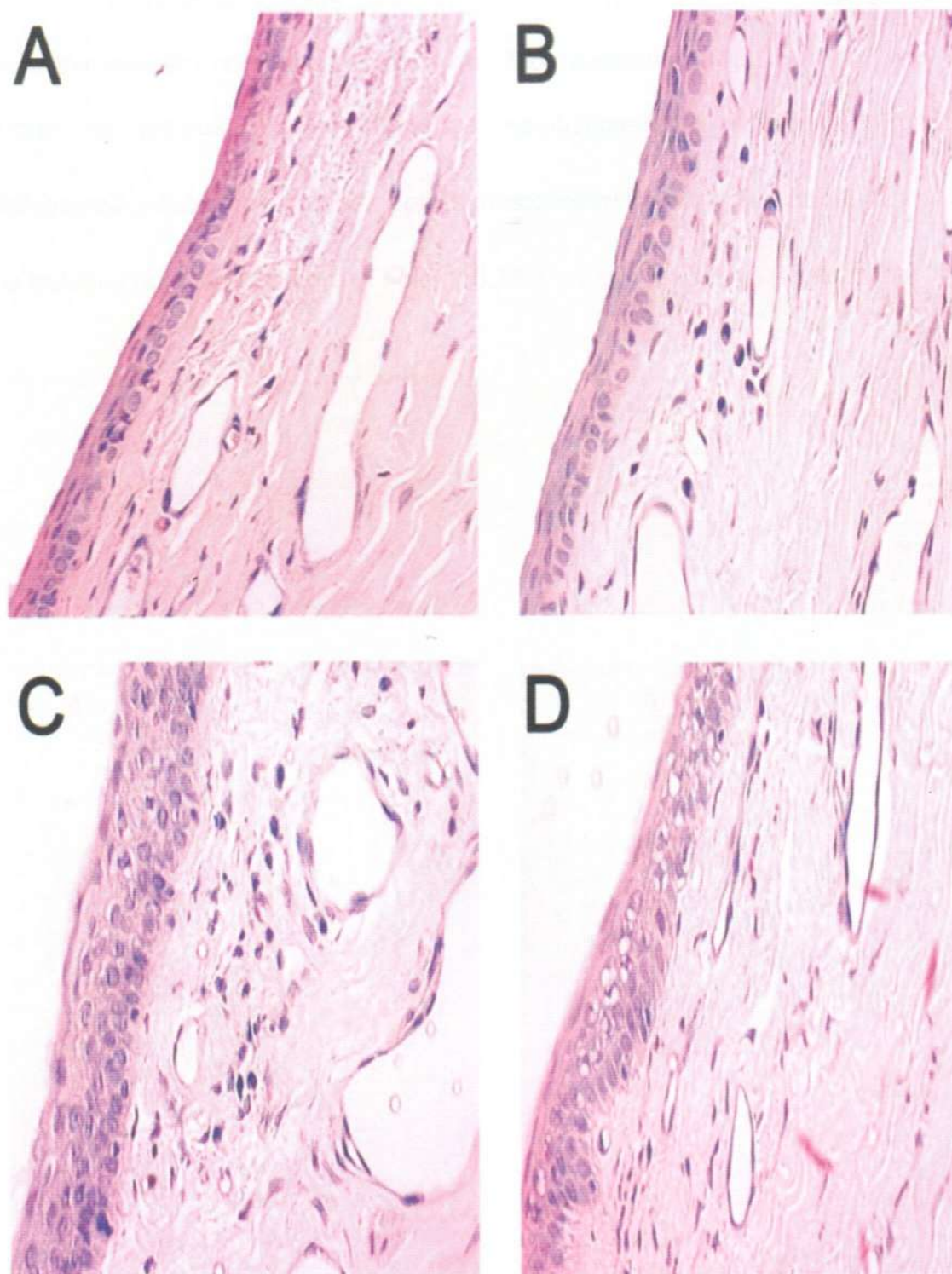


Figura 6 – Fotomicrografias evidenciando o aumento da espessura epitelial nos olhos tratados com bimatoprost+timolol (B), latanoprost+timolol (C) e travoprost+timolol (D), em relação ao olho sem tratamento (A). A maior espessura é observada no grupo tratado com latanoprost+timolol.

O número de células calciformes por campo, aumentou nos olhos tratados, quando comparado com o de olhos controles ($10,00 \pm 0,44$), em todos os grupos. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos olhos tratados com bimatoprost+timolol ($16,11 \pm 2,42$) e os tratados com latanoprost+timolol ($13,18 \pm 1,60$) ($p=0,016$) (Figuras 7).

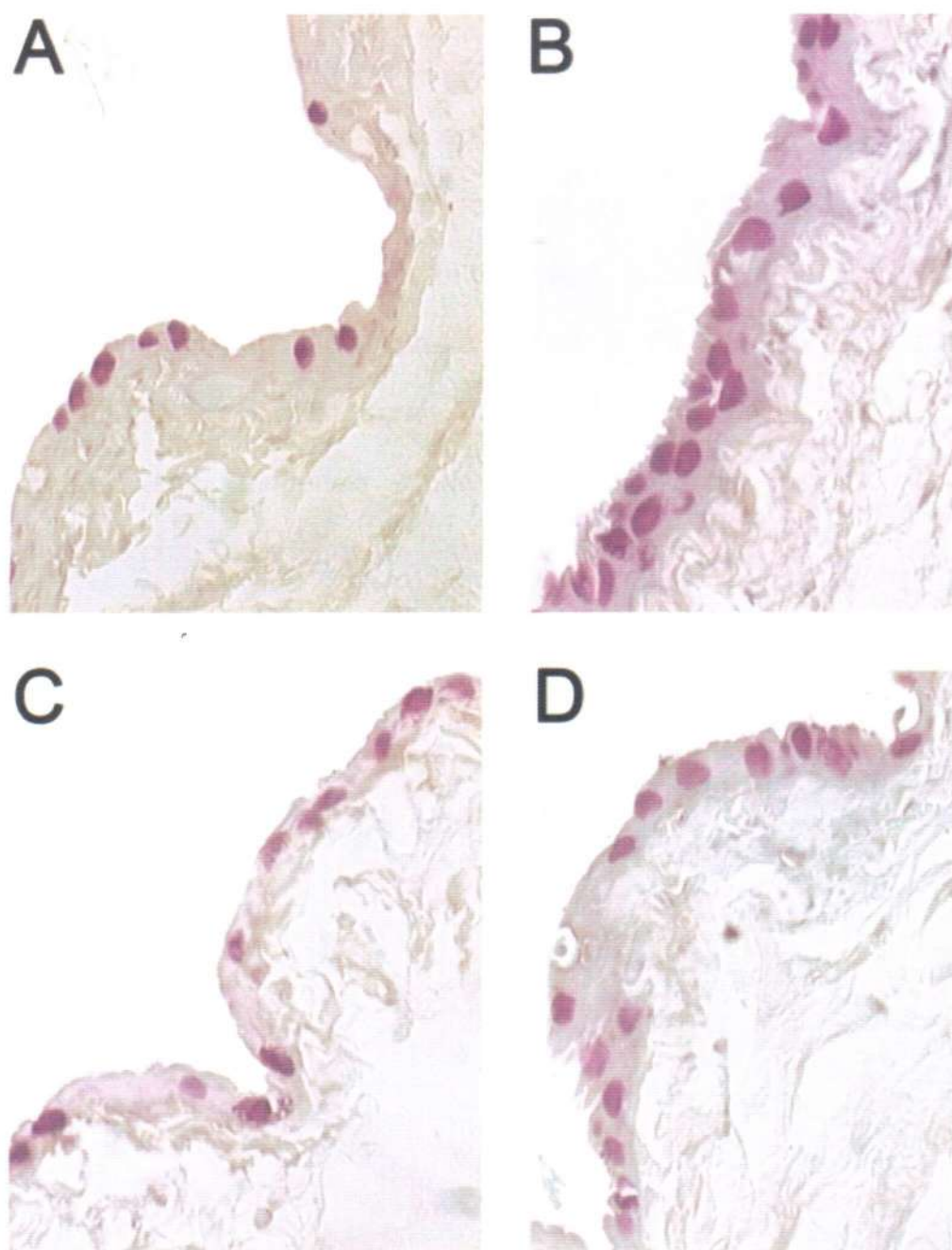


Figura 7 - Fotomicrografias de conjuntivas (magnificação de 400x) coradas com PAS, evidenciando o aumento mais intenso do número de células caliciformes nos olhos tratados com bimatoprost+timolol (B) e travoprost+timolol (D), e menor nos olhos tratados com latanoprost+timolol (C), em relação ao olho sem tratamento (A).

Todos os olhos (tratados e controles) demonstraram algum grau de marcação pela anti-actina músculo liso (grau de fibrose). que foram avaliadas qualitativamente em: ausente (0), leve (2), moderado (3) e severa (4). Nos olhos controles, esse grau variou de mínimo a leve (0-1). Nos olhos tratados com travoprostá+timolol, foi observado maior grau de fibrose (grau 3-4), seguido pelo grupo bimatoprostá+timolol (grau 2-3) e, em seguida, pelo grupo latanoprostá+timolol (grau 1-2). Essas diferenças, apesar de mostrarem uma tendência numérica, não foram estatisticamente significativas pelo Teste Exato de Fisher (Gráfico 2 e Figura 8).

30 dias para Fibrose?

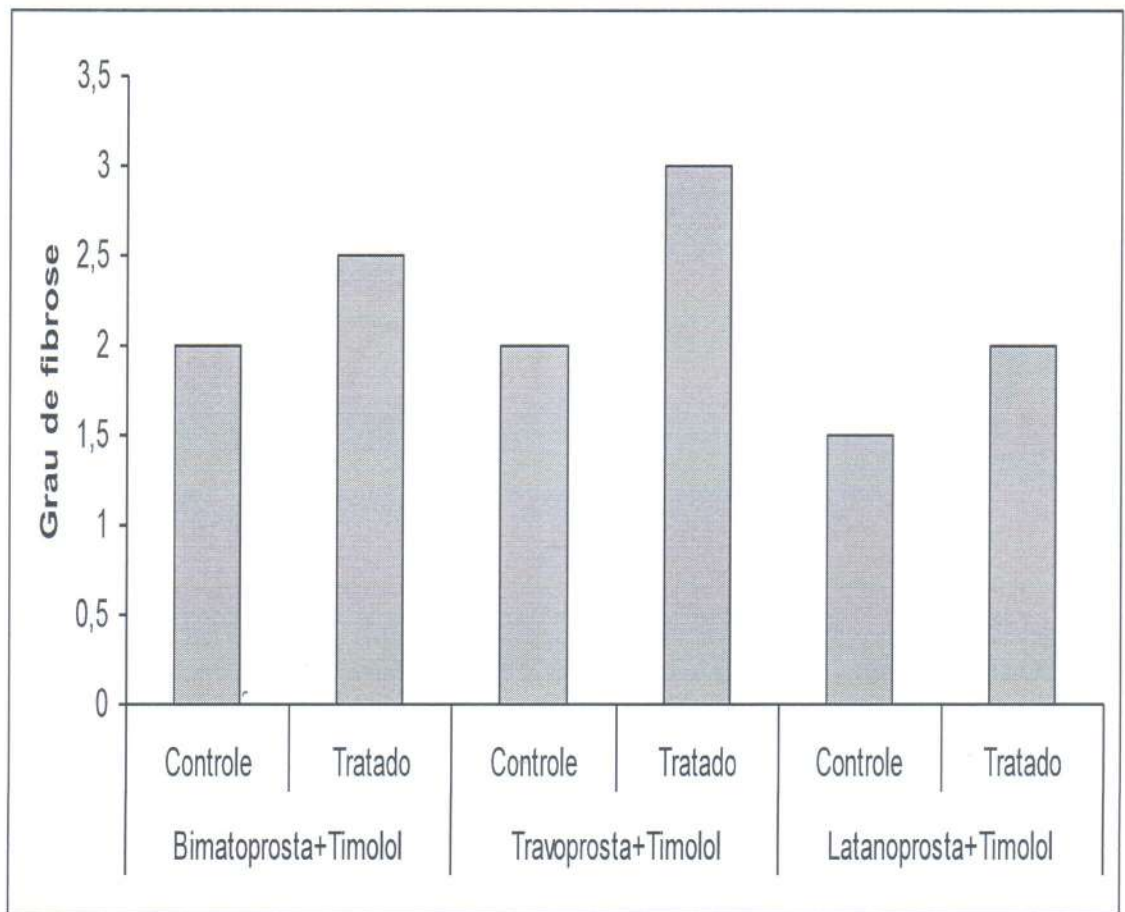


Gráfico 2 - Grau de fibrose da conjuntiva de coelhos, comparando os olhos controle aos tratados, entre os três grupos de tratamento: bimatoprost+timolol (G1), travoprost+timolol (G2) e latanoprost+timolol (G3). Note o maior grau de fibrose no grupo tratado com travoprost+timolol. Avaliação imunoistoquímica realizada com anti-actina

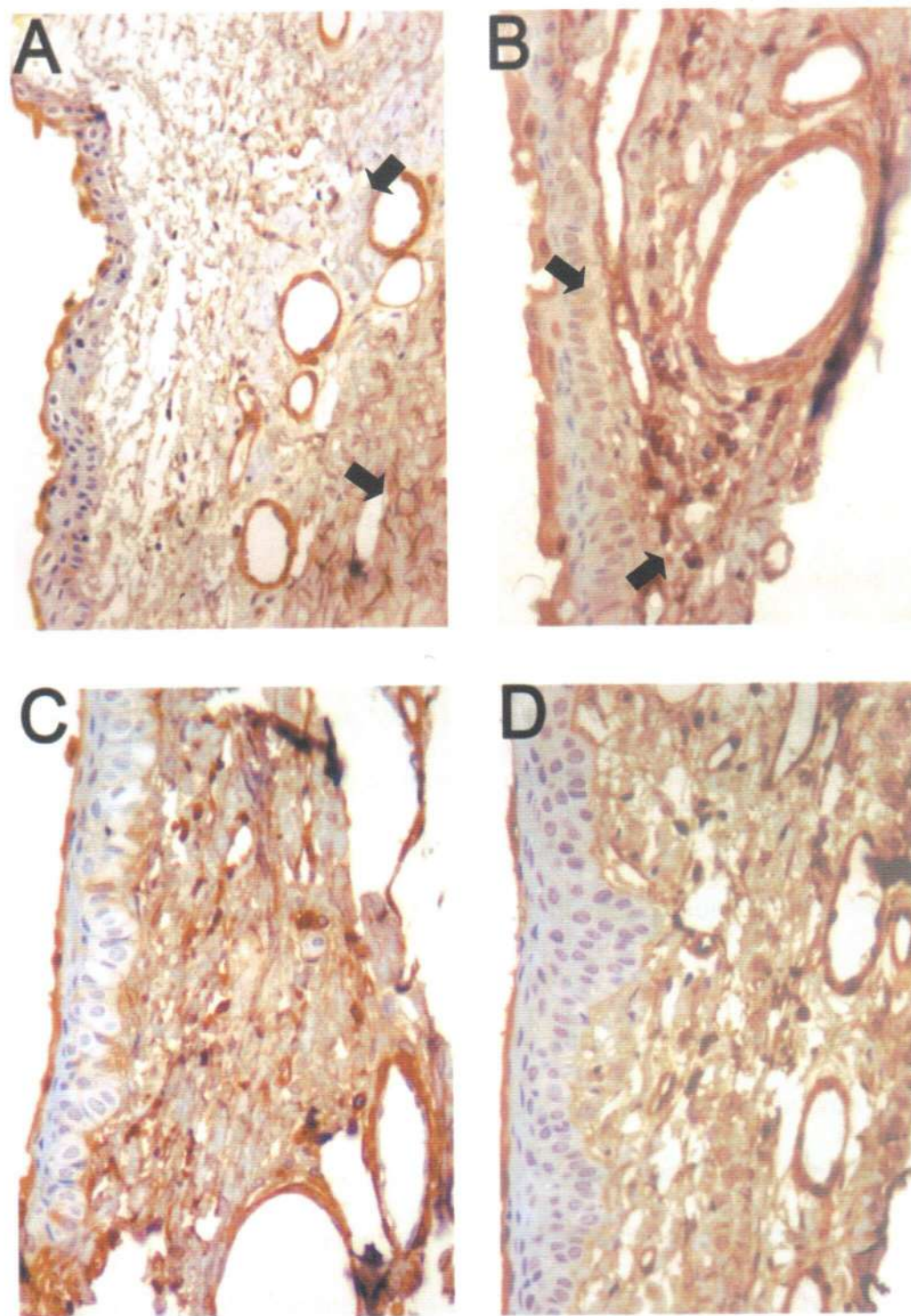


Figura 8 – Fotomicrografias de conjuntivas (magnificação de 400x) marcadas com anti-actina, evidenciando o aumento no número de fibroblastos nos olhos tratados com travoprost+timolol (B), latanoprost+timolol (C) e bimatoprost+timolol (D), em relação ao olho sem tratamento(A).

DISCUSSÃO

O tratamento do glaucoma com drogas tópicas tem sido associado a alterações inflamatórias da superfície ocular, que inclui um aumento na deposição de colágeno subepitelial, redução do número de células caliciformes e aumento do número de mastócitos, fibroblastos, linfócitos e macrófagos em substância própria. Além dos efeitos das alterações conjuntivais, também ocorre um atraso na regeneração epitelial da córnea e instabilidade do filme lacrimal, devido a uma redução da porção mucosa da lágrima. Estas alterações causam desconforto no momento da instilação do colírio e se tornam um risco potencial de insuficiência de filtrar em procedimentos cirúrgicos, como a trabeculectomia (Broadway et al, 19942, Mietz et al, 2001; Pisella et al, 2004). Um estudo realizado por Baudouin et al. (1999) avaliou a conjuntiva, através de biopsia, dos pacientes tratados a longo prazo com drogas antiglaucomatosas e encontrou uma elevada concentração de macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos, além de uma redução no número de células caliciformes.

No presente estudo observou-se um aumento no número de células inflamatórias em olhos tratados com associações fixas de maleato de timolol e análogos de prostaglandinas. No entanto, também ocorreu um aumento no número de células caliciformes em todos os grupos (latanoprost + timolol, travoprost + timolol e bimatoprost + timolol). Este aumento provavelmente está associado a análogos de prostaglandinas, e não ao timolol, uma vez que estudos anteriores já demonstraram que os beta-bloqueadores induzem uma redução no número de células caliciformes e na produção lacrimal

(Shimazaki et al., 2000). Russ et al. (2007) também observaram um aumento no número de células caliciformes conjuntivais em coelhos tratados com análogos de prostaglandinas, o que não ocorreu naqueles tratados com timolol. Outro fato a ser considerado é o resultado de um estudo que demonstrou que a hiperplasia de células caliciformes da conjuntiva está associada a ambientes poluídos, indicando que este aumento pode ser uma resposta ocular a agressão externa (Novaes et al., 2007). O aumento de células caliciformes provocadas por análogos da prostaglandina pode ser associado com um efeito protetor da superfície ocular, mas também poderia ser um reflexo de uma maior potência de agressão destas drogas. Russ et al. (2007) observaram um infiltrado inflamatório menos severo nos grupos tratados com análogos de prostaglandinas do que no grupo tratado com timolol. A nossa investigação demonstrou um aumento significativo no número de células inflamatórias em todos os olhos tratados, mas não houve diferença no grau de reação inflamatória incitado comparando as três combinações. Este aumento é, provavelmente, mais relacionado com timolol do que análogos de prostaglandinas. Outra consideração a ser feita é a presença de cloreto de benzalcônio (BAK) nestas formulações. BAK é o conservante mais comum usado em colírios antiglaucomatosos. (Pisella et al., 2004). Muitos estudos tem relacionado o efeito de toxicidade celular e inflamação da superfície ocular causada pela terapia oftálmica tópica com BAK (Guenoun et al., 2005). Comparações entre o timolol puro e o preservado com BAK mostraram um nível mais baixo de efeitos tóxicos no primeiro grupo, e indução de infiltrado inflamatório no grupo tratado com o

conservante (Baudouin et al., 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que nenhum dos análogos de prostaglandinas parece induzir a estimulação direta das vias inflamatórias envolvendo moléculas de adesão ou antígenos de classe II. Este padrão de toxicidade parece estar relacionada com BAK.

Um efeito protetor inflamatório das prostaglandinas foi proposto por Guenoun et al. (2005), que notou, *in vitro*, que as prostaglandinas revelaram uma tendência para menor toxicidade, quando comparadas ao BAK. Cvenkel e Ihan (2002) realizaram citometria de fluxo para verificar os níveis de HLA-DR (moléculas expressas por macrófagos, linfócitos B) em impressões conjuntivais de pacientes sem sinais clínicos de inflamação, tratados com drogas antiglaucomatosas (latanoprost, betaxolol e timolol) com BAK como conservante. Observaram que todos os olhos tratados, independentemente da droga, demonstraram um aumento da expressão de HLA-DR, o que indica que a terapia tópica com BAK a induz inflamação da conjuntiva subclínica. Broadway et al. estudaram as modificações oculares em pacientes tratados por mais de três anos, com drogas antiglaucomatosas, isoladas ou combinadas (beta-bloqueadores, mióticos e simpatomiméticos), em dois estudos realizados em 1994. Estes estudos demonstraram uma redução no número de células calciformes, aumento do número de macrófagos e linfócitos no epitélio conjuntival, e aumento do número de fibroblastos, macrófagos, mastócitos e linfócitos em substância própria, além de metaplasia epitelial com alterações da estrutura no epitélio.

O aumento da espessura epitelial observado no presente estudo é consistente com resultados relatados na literatura. Em uma experiência

realizada em coelhos por Mietz et al. (2001), foi notado que os olhos tratados com timolol preservado foram marcados com anticorpo anti-actina, um anticorpo dirigido às proteínas do citoesqueleto celular de fibroblastos.

Na nossa investigação, o subepitélio dos olhos tratados de todos os grupos, foi corado com o mesmo anticorpo. Não houve diferença significativa entre os grupos, mas uma tendência numérica de mais intenso grau de reação no grupo tratado com travoprost + timolol. A proliferação de fibroblastos mais intensa neste grupo pode estar relacionada com a concentração mais elevada de BAK no colírio.

CONCLUSÃO

A avaliação do infiltrado inflamatório em olhos tratados, na presente investigação, não revelou qualquer diferença no número de células inflamatórias, comparando as três combinações fixas. A combinação travoprost + timolol demonstrou um maior grau de fibrose. A combinação fixa de bimatoprost + timolol foi a que acarretou maior aumento no número de células calciformes. A combinação de latanoprost + timolol parece provocar uma maior reação vascular, pois os olhos tratados com estas drogas apresentaram a vascularização mais intensa, além de ser responsável pelo aumento importante da espessura epitelial.

7- ARTIGO 02

TRATAMENTO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA CONJUNTIVAL COM CICLOSPORINA, PREDNISOLONA E ASSOCIAÇÃO DE CICLOSPORINA E PREDNISOLONA NO PÓS-OPERATÓRIO DE TRABECULECTOMIA EM COELHOS

Núbia Vanessa Lima de Faria, Palloma Rose, Paulo Augusto Mello, Lúcia Noronha,
Fabiano Montfiani-Ferreira, Heloisa Helena Russ, Sebastião Cronemberger

RESUMO

OBJETIVO :Esta investigação objetiva comparar diferentes protocolos para controle da inflamação utilizando drogas de aplicação tópica no pós-operatório de trabeculectomia (TREC) em coelhos submetidos previamente à terapia medicamentosa antiglaucomatosa. METODOS: Trinta coelhos tiveram o olho esquerdo tratado com uma gota diária de bimatoprost 0,03%, durante 30 dias. Foram então submetidos à TREC e divididos em três grupos (G1, G2 e G3). O grupo 1 recebeu acetato de prednisolona 1% (Predfort®) quatro vezes ao dia; o grupo 2, ciclosporina 0,05% (Restasis®) duas vezes ao dia; e o grupo 3 recebeu a associação de acetato de prednisolona quatro vezes ao dia e ciclosporina duas vezes ao dia durante. 7 dias

Todos os animais receberam também colírio antibiótico a base de gatifloxacina 0,03%, (Zymar ®) quatro vezes ao dia . Após os sete dias da

cirurgia todos os animais foram eutanasiados. A histomorfometria foi realizada através de hematoxina-eosina (HE), avaliando-se espessura do epitélio conjuntival, diâmetro dos vasos sanguíneos e área vascular (perímetro dos vasos sanguíneos). A imunohistoquímica (IHQ) foi realizada por meio de três marcadores: anti-actina, fator VIII e interleucina-6, para avaliar o nível de fibrose, neovascularização e infiltrado inflamatório, respectivamente. **RESULTADOS:** O grupo 3 (associação de ciclosporina+prednisolona) apresentou menor espessura epitelial (médias dos grupos prednisolona, ciclosporina e prednisolona+ciclosporina: $29,3 \pm 10,27 \mu\text{m}$; $25,1 \pm 5,16 \mu\text{m}$ e $24,4 \pm 3,81$, respectivamente $p= 0,03$), diâmetro e número de vasos, demonstradas pelo fator VIII foi menor nos animais tratados com ciclosporina+prednisolona (8,07) quando comparado àqueles tratados com prednisolona (17,50) e ciclosporina (11,86) ($p<0,001$), além de menor grau de infiltrado inflamatório e fibrose conjuntival no grupo da associação de drogas (mediana 1,5) quando comparado ao da prednisolona isolada (mediana 4,0) e ao da ciclosporina isolada (mediana 3,0) ($p<0,001$) **CONCLUSAO:** A associação de prednisolona com ciclosporina parece ser mais eficiente que as drogas isoladas, no controle da reação inflamatória pós-operatória da TREC em coelhos.

Palavras-chave: conjuntiva, glaucoma, terapia medicamentosa, histologia, histomorfometria, imunoistoquímica.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To compare different anti-inflammatory topical drug protocols post-trabeculectomy (TRAB) in rabbits. **METHODS** Thirty rabbits had the left eye treated with a daily eyedrop of bimatoprost 0,03%, for 30 days. Then, they were underwent a TRAB and divided in three groups (G1, G2 and G3). Rabbits from G1 received 1.0% prednisolone acetate four times a day ; G2 0.05% cyclosporine two times a day; and G3 received the association of prednisolone acetate four times a day and cyclosporine two times a day . After seven days, all rabbits were euthanized and enucleated. Histomorphometry was performed in HE stained sections to evaluate epithelial thickness, blood vessel diameter and vascular area (blood vessels perimeter). Immunohistochemistry staining using AC Smooth Muscle Anti-Actin, Anti-Factor VIII and Anti-IL-6 was performed to evaluate fibrosis, neovascularization and inflammatory infiltrate, respectively. **RESULTS:** Group 3 (association of prednisolone and cyclosporine) showed less conjunctival epithelial thickness, diameter and number of blood vessels, besides less inflammatory infiltrate and fibrosis. **CONCLUSION:** This study suggests the association of prednisolone and cyclosporine seems to be more efficient than isolated drugs, in controlling inflammatory reaction in the post-operative of trabeculectomy in rabbits.

Keywords: conjunctiva, glaucoma, drug therapy, histology, histomorphometry, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO:

O glaucoma é uma neuropatia óptica progressiva multifatorial, com mudanças estruturais características no disco óptico, freqüentemente acompanhada por mudanças no campo visual, que requer tratamento por longo prazo com drogas tópicas hipotensivas (Gordon et al., 2002; Weinreb e Medeiros, 2005). Existem várias classes de drogas disponíveis para o tratamento desta doença, incluindo agentes colinérgicos, β -bloqueadores, agonistas α -adrenérgicos, inibidores da anidrase carbônica e, mais recentemente, os análogos de prostaglandinas (Ritch et al., 1996).

Nos pacientes tratados com drogas tópicas a conjuntiva atua como uma membrana semipermeável, permitindo a absorção destes princípios e sua ação no meio intraocular. Quando o tratamento tópico é crônico, a conjuntiva responde com formação de cicatriz, queratinização e neovascularização, o que pode alterar a forma e função da membrana (Brandt et al., 1991). Esses efeitos podem ser mais ou menos intensos, dependendo da duração do tratamento, além da concentração e quantidade de drogas usadas (Broadway et al. 1994).

Há fortes evidências que essas mudanças na superfície conjuntival possam aumentar o risco de insucesso cirúrgico nos pacientes com glaucoma submetidos a cirurgias fistulantes (Baoudouin et al., 1994; Broadway et al., 1994; Mietz et al., 1994).

Broadway et al. (1994) identificaram a inflamação conjuntival subclínica causada por terapia tópica prévia como um fator de risco de falha da trabeculectomia. A redução da taxa de sucesso dos procedimentos

fistulantes do glaucoma provavelmente se deve a ativação dos fibroblastos na conjuntiva, cápsula de Tenon e episclera, levando a uma formação de cicatriz tecidual ao redor do *flap* escleral (Addicks et al., 1983; Young et al., 1990; Herreras et al., 1993). Neste estudo, a utilização de um protocolo prévio de bimatoprost tópica 0,03% buscou mimetizar essas condições adversas às cirurgias fistulantes.

A trabeculectomia (TREC) é o procedimento cirúrgico mais utilizado no glaucoma. A técnica é iniciada com a incisão de um retalho de conjuntiva e cápsula de Tennon, que pode ter sua base no limbo corneano ou no fórnice conjuntival. Após a dissecação da conjuntiva o leito escleral fica exposto, então é realizado um retalho escleral de base límbica e posteriormente a remoção de uma porção da malha trabecular e da periferia da córnea, o que permitirá um maior efluxo de humor aquoso no pós-cirúrgico. Procede-se então a sutura do retalho escleral com fio não-absorvível em padrão isolado simples e a sutura da conjuntiva e cápsula de Tennon com fio absorvível em padrão contínuo (Susanna e Medeiros, 2002). Em 2001, Peng Khaw et al. propõem modificações às técnicas tradicionais da trabeculectomia que, segundo sua experiência, reduzem as complicações cirúrgicas e aumentam as chances de sucesso da trabeculectomia, favorecendo o direcionamento posterior do fluxo do aquoso e suturas removíveis.

No pós-operatório da trabeculectomia ocorrem mecanismos de reparação tecidual, como em qualquer processo cirúrgico, modulados por mediadores inflamatórios (histamina, serotonina, prostaglandina,

Faltou o grupo

leucotrienos e outras cininas) que levam à migração de células neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos para o foco de cicatrização. Este é um processo desejado em outros procedimentos cirúrgicos. Nas cirurgias fistulantes do glaucoma, no entanto, procura-se manter a fístula patente para permitir a drenagem do humor aquoso e a consequente redução da PIO (Lama e Fechtner, 2003).

Para evitar a proliferação fibroblástica e a fibrose subconjuntival, que ocasionam o fechamento da fístula das cirurgias fistulantes, são utilizados antimetabólitos que reduzem a taxa de mitose celular (Vijava et al., 2000; Bindlish et al., 2002). A mitomicina C (um antibiótico produzido a partir da fermentação do fungo *Streptomyces caespitosus*, que atua em todas as fases da replicação) e o 5-fluoracil (análogo da pirimidina que é incorporado à cadeia de DNA, e impede a síntese apenas na fase S do ciclo celular) são as drogas mais utilizadas (Moura e Mello, 1999; Francis et al., 2005).

O uso dessas drogas aumenta o sucesso da fístula, no entanto, traz mais chance de complicações relacionadas à hipotonia e endoftalmite (Susanna e Medeiros, 2002; WuDunn et al., 2002; Fontana et al., 2006).

A ciclosporina é uma droga imunomoduladora, que também tem propriedades antimetabólicas, sendo capaz de controlar a proliferação celular *in vitro*, e há alguns anos passou a ser estudada *in vivo*, no pós-operatório da TREC (Turacli et al, 1996; Cristofanilli et al., 2001).

Os corticóides atuam suprimindo a síntese de mediadores inflamatórios e, consequentemente, reduzindo o número de leucócitos e fibroblastos no foco inflamatório (Lama e Fechtner, 2003). O efeito dessas

celulas

drogas na TREC ainda não está totalmente estabelecido, porém estudos demonstram que sua utilização tópica no pré e no pós-operatório mantém a redução da PIO por mais tempo, aumentando o sucesso da TREC (Moura e Mello, 1999; Lama e Fechtner, 2003; Kahook et al., 2009).

Este trabalho objetiva comparar três diferentes protocolos anti-inflamatórios no pós-operatório da trabeculectomia em olhos de coelhos. Avaliou-se a reação inflamatória após o uso de acetato de prednisolona 1%, de ciclosporina 0,05% e da associação de prednisolona 1% e ciclosporina 0,05%).

MATERIAL E MÉTODOS:

Trinta fêmeas de coelhos da raça Nova Zelândia com idades (5 meses) e pesos (1,7kg) similares foram tratados durante trinta dias com colírio de bimatoprost 0,03%. Uma gota do colírio foi instilada no olho esquerdo de todos os animais, e o olho direito serviu como controle. O colírio possui o conservante cloreto de benzalcônio na concentração de 0,005%. No 30º dia, foi realizada a TREC sem antimetabólitos, em todos os animais, por um mesmo cirurgião e os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos de dez.

Os três protocolos de pós-operatório foram: acetato de prednisolona 1%, quatro vezes ao dia (grupo 1), ciclosporina 0,05%, duas vezes ao dia (grupo 2) e associação de acetato de prednisolona 1% quatro vezes ao dia com ciclosporina 0,05% duas vezes ao dia (grupo 3). Todos os grupos

receberam antibioticoterapia com colírio de gatifloxacina 0,03%, quatro vezes ao dia. Após uma semana, os animais foram submetidos à eutanásia. Os bulbos oculares foram imediatamente fixados em formol a 10% por 24 horas. Após a fixação os olhos foram seccionados e passaram por processamento padrão de desidratação com álcool de graduação crescente, até álcool absoluto 100%, aclaração com xilol e posterior inclusão em parafina (Bacha Jr. e Wood, 1991). Os cortes do bloco parafinado realizados com micrótomo foram então corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e submetidos à imunohistoquímica com os seguintes marcadores: anti-fator VIII, anti-actina e anti-interleucina 6.

A avaliação histomorfométrica foi realizada com o *software* Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics®, Silver Spring, MD). As imagens digitais foram feitas sob magnificação de 400x e armazenadas, utilizando o mesmo programa. Foram selecionados dois pontos de cada lâmina, correspondentes à conjuntiva bulbar mais próxima ao limbo corneano (Figura 3). Após a captura das imagens, foram então selecionados aleatoriamente dois segmentos de epitélio conjuntival de 200 µm de comprimento e 5 µm de espessura, de cada foto. A medida de segmentos lineares de mesmo tamanho permitiu a avaliação dos seguintes parâmetros: diâmetro dos vasos sanguíneos e espessura do epitélio conjuntival, que foram medidos usando ferramentas virtuais do programa.

A avaliação imunohistoquímica foi realizada com captação de imagens com magnificação de 400x, utilizando o mesmo *software*. Cada imagem, incluindo epitélio e lâmina própria, foi virtualmente gradeada (150 X 200 µm)

e os três subcampos mais próximos ao epitélio foram então avaliados para que fosse possível uma análise mais específica da região subepitelial da conjuntiva e não de sua lâmina própria em cada slide. O marcador anti-actina demonstrou o grau de fibrose inflamatória (fibroblastos marcados pelo anticorpo). Esse parâmetro foi avaliado por meio de variáveis categóricas qualitativas, atribuindo-se números de acordo com intensidade do marcador presente no corte histológico (1: mínimo; 2: leve; 3: moderado e 4: severo), a cada campo de 400x, com repetição de 2 vezes por lâmina. O marcador fator VIII evidenciou a parede dos vasos presentes no tecido conjuntival, sendo o grau de neovascularização avaliado por meio da contagem dos vasos sanguíneos marcados (contados por campo de 400x, com repetição de 2 vezes por lâmina). O grau de infiltrado inflamatório foi avaliado por meio da contagem de áreas marcadas pela interleucina-6, presentes no corte histológico marcados (também realizada análise por campo de 400x, com repetição de duas vezes por lâmina). O responsável pela leitura das lâminas não teve conhecimento sobre as identificações dos grupos. Foram realizadas 10 medições repetidas dos parâmetros pelo mesmo avaliador, o que resultou em baixos coeficientes de variabilidade.

Foi utilizado o teste One-way ANOVA, com nível de significância de 5%, para comparar as variáveis contínuas e submetidos ao pós-teste de Fisher (para comparações entre até três grupos) ou teste de Tukey-Kramer (para comparações entre mais de três grupos). As diferenças foram estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05. Tais variáveis foram apresentadas como média \pm desvio padrão. Os

procedimentos experimentais seguiram a ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research e da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo no 038/2008).

RESULTADOS

Na avaliação histomorfométrica o grupo tratado com prednisolona demonstrou maior espessura do epitélio conjuntival ($p=0,03$), sendo as médias dos grupos prednisolona, ciclosporina e prednisolona+ciclosporina: $29,3 \pm 10,27 \mu\text{m}$; $25,1 \pm 5,16 \mu\text{m}$ e $24,4 \pm 3,81$, respectivamente. O diâmetro dos vasos sanguíneos foi significativamente maior nos animais tratados com prednisolona ($30,3 \pm 11,28 \mu\text{m}$) e ciclosporina ($27,7 \pm 10,90 \mu\text{m}$) ($p=0,0011$ e $p<0,0001$, respectivamente), em relação ao grupo tratado com a associação das duas drogas ($19,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$). (Tabela2).

O grau de fibrose também foi menos intenso no grupo da associação de drogas (grau leve;1) quando comparado ao da prednisolona isolada (grau severo:4) e ao da ciclosporina isolada (grau moderado:3) ($p<0,001$) (Gráfico 3 e Figura 9).

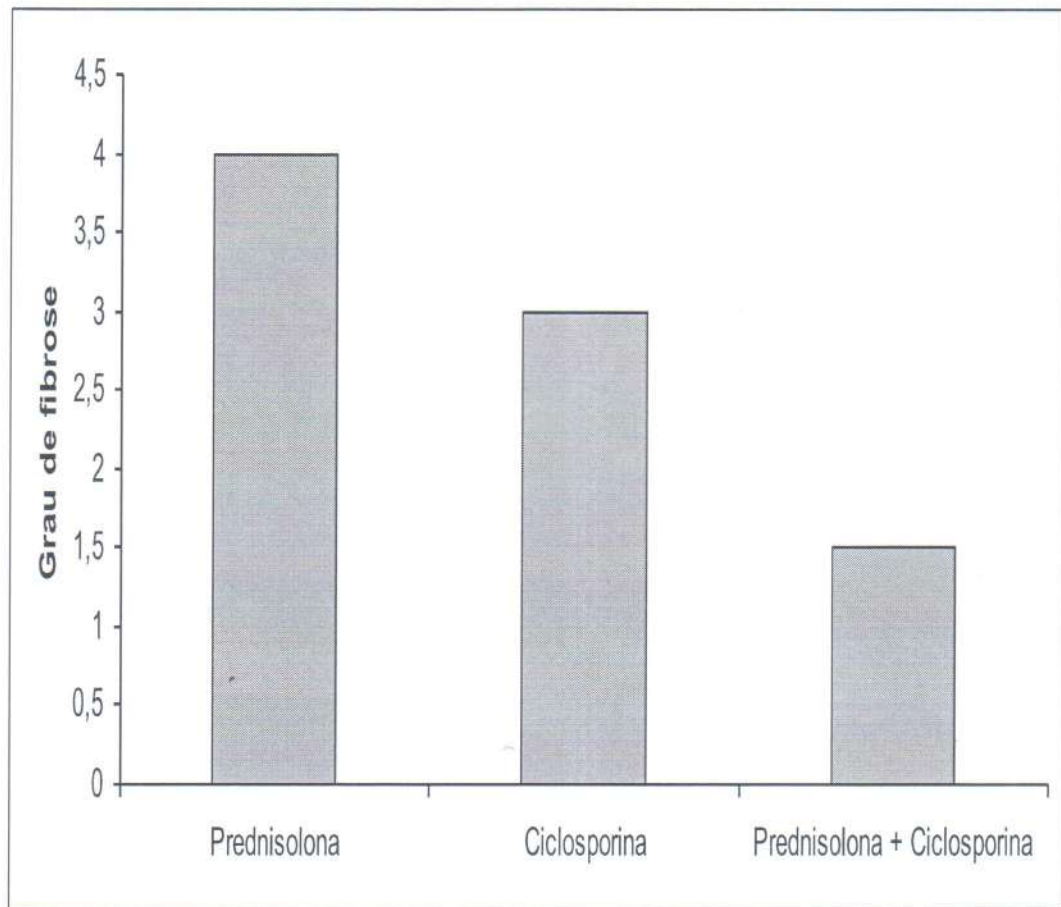


Gráfico 3 - Comparação do grau de fibrose conjuntival entre os três grupos de tratamento: prednisolona 0,01% (G1), ciclosporina 0,05% (G2) e prednisolona 1% com ciclosporina 0,05% (G3). Note o menor grau de fibrose observado no grupo tratado com a associação de drogas. Avaliação imunohistoquímica realizada com anti-actina, por meio de variáveis numéricas discretas (1: mínimo; 2: leve; 3: moderado e 4: forte).

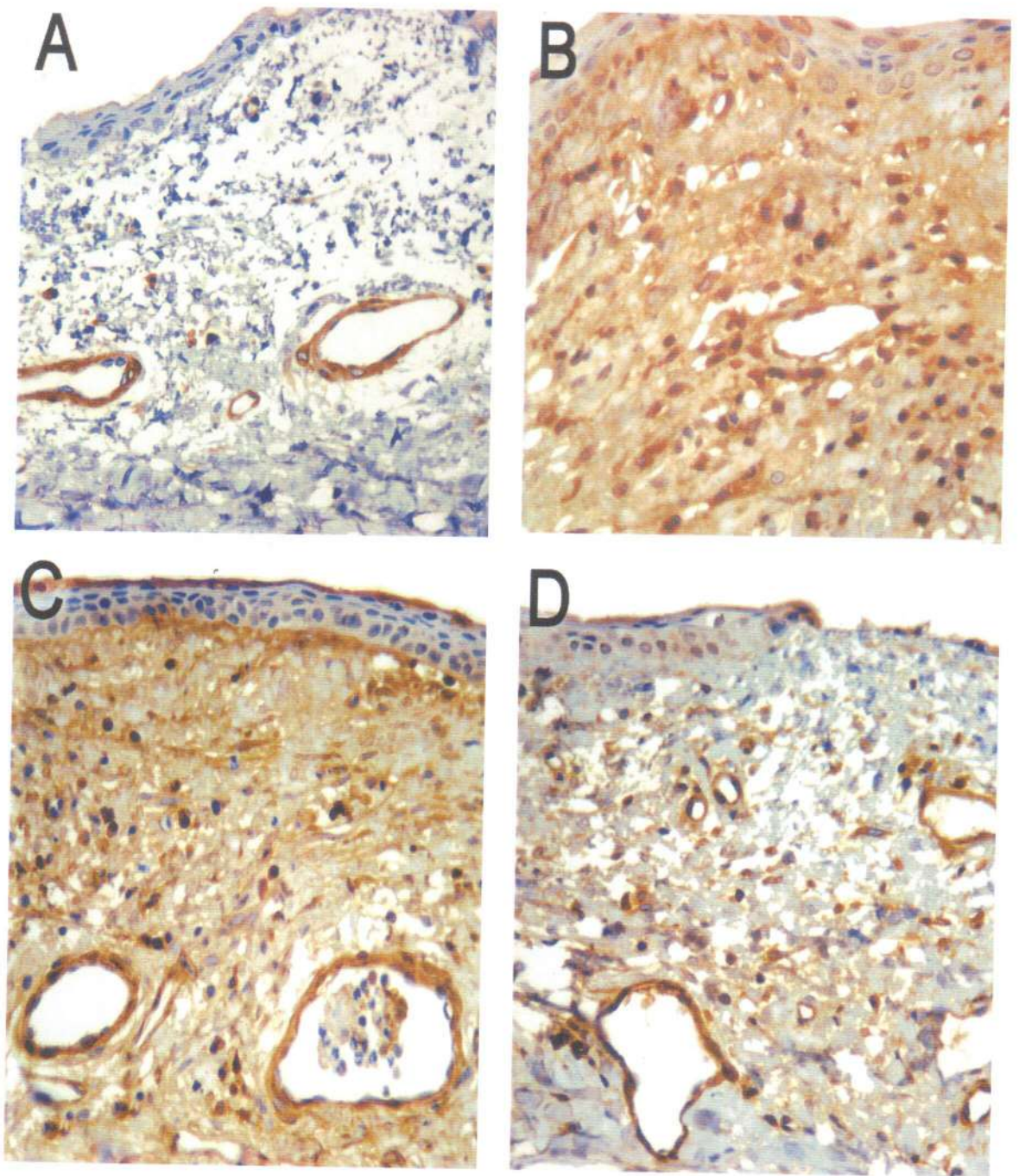


Figura 9 – Fotomicrografias de conjuntiva (magnificação de 400x) da avaliação imunohistoquímica realizada com anti-actina, evidenciando os fibroblastos do subepitélio dos seguintes grupos: A) controle; B) prednisolona; C) ciclosporina; D) ciclosporina+prednisolona.

A quantidade de vasos reativos ao processo inflamatório demonstradas pelo fator VIII foi menor nos animais tratados com ciclosporina+prednisolona (8,07) quando comparado àqueles tratados com prednisolona (17,50) e ciclosporina (11,86) ($p < 0,001$) (Tabela 2 e Figura 10)

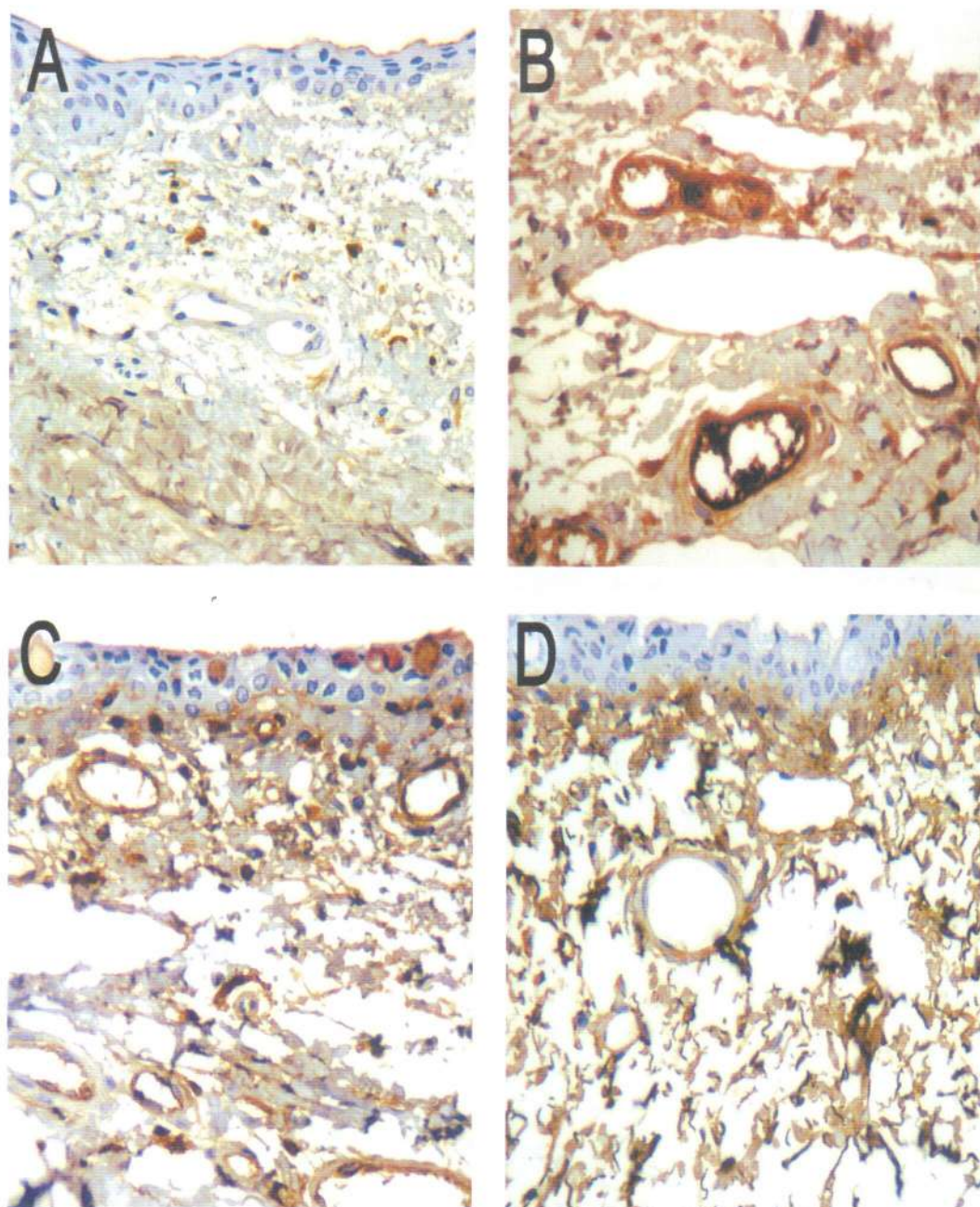


Figura 10 - Imunohistoquímica realizada com anti-fator VIII, evidenciando as células endoteliais dos vasos sanguíneos reativos no processo inflamatório nos seguintes grupos: A) controle; B) prednisolona; C) ciclosporina; D) ciclosporina+prednisolona.

A associação de drogas também mostrou, na avaliação pela anti-interleucina 6, menor grau de infiltrado inflamatório (6,60) quando comparado a prednisolona (27,37) ($p=0,0005$) e a ciclosporina (13,20) ($p<0,001$) (Tabela 2 e Figura 11).

	Espessura do epitélio conjuntival (μm)	P	Diâmetro dos vasos sanguíneos (μm)	P	Vasos reativos (quantidade)	P	Anti-interleucina 6 (quantidade)	P
Prednisolona (G1)	29,3 \pm 10,27	P<0,03	30,3 \pm 11,28	P<0,0011	17,50	P<0,001	27,37	P=0,0005
Ciclosporina (G2)	25,1 \pm 5,16	P=0,03	27,7 \pm 10,90	P<0,0001	11,86	P<0,001	13,20	P<0,001
Prednisolona + Ciclosporina (G3)	24,4 \pm 3,81		19,8 \pm 6,9		8,07		6,60	

Tabela 2- Comparação dos parâmetros avaliados entre os três grupos de tratamento: prednisolona 1% (G1), ciclosporina 0,05% (G2) e prednisolona 1% com ciclosporina 0,05% (G3).

DISCUSSÃO

A trabeculectomia tem sido usada para controlar o glaucoma há mais de trinta anos e ainda permanece como a técnica incisional mais comum no tratamento da doença, com uma taxa de sucesso relativamente alta (Broadway et al., 2004; Fontana et al., 2006).

Muitos estudos clínicos e experimentais demonstram fortes evidências de que o uso crônico de drogas antiglaucomatosas tópicas pode induzir alterações na superfície conjuntival, causando desconforto na instilação, inflamação conjuntival, instabilidade do filme lacrimal, fibrose subconjuntival, apoptose das células do epitélio conjuntival e modificações na superfície corneana (Sherwood et al., 1989; De Saint Jean et al., 1999; Bensoussan et al., 2003; Russ et al., 2007). Alguns pesquisadores sugerem que estas mudanças tornem o prognóstico da trabeculectomia menos favorável em pacientes que receberam terapia antiglaucoma tópica prévia (Lavin et al., 1990; Brandt et al., 1991; Herreras et al., 1993; Broadway et al., 1994; Pfeiffer et al., 2001). Grande parte destas alterações conjuntivais têm sido associadas, por estudos clínicos, laboratoriais e experimentais, não só às próprias drogas antiglaucomatosas, mas ao cloreto de benzalcônio (BAK), o conservante mais utilizado em medicações oftálmicas tópicas (Baudouin et al., 1994; Turacli et al., 1996).

Neste trabalho, a terapia prévia com bimatoprost, que possui BAK como conservante, provocou efeitos colaterais conjuntivais já referidos por outros autores, como mudanças na espessura epitelial, infiltrado inflamatório

conjuntival, vascularização e fibrose incluíse conforme em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de autores, alterações mais evidentes no grupo da bimatoprost (Baudouin et al. 1999; Russ et al., 2007). A magnitude destas alterações foi modulada pela ação da ciclosporina e da prednisolona em diferentes níveis.

A causa mais freqüente de falha na TREC é a formação de um tecido fibrovascular episcleral, ao redor do *flap* cirúrgico (Mietz et al., 2002). Para prevenir a inflamação que pode provocar esta aderência são usados antimetabólitos, que atuam inibindo a síntese do DNA e reduzem a formação de fibrose, mantendo assim a patência cirúrgica e a PIO controlada (Vijava et al., 2000; Kahook et al, 2009).

O uso de antimetabólitos, no entanto, também pode acarretar efeitos colaterais, como infecção ("blebite" e endoftalmite) e vazamento da bolha, levando a uma redução excessiva da PIO e perda da acuidade visual (Bindlish et al., 2002; Fontana et al., 2006). Alguns estudos sugerem que essas complicações são menos severas nos casos em que se usa 5-fluorouracil (5-FU), porém mantendo-se menor redução pressórica (WuDunn et al., 2002). A mitomicina C (MMC) e o 5-fluorouracil (5-FU) são as drogas mais estudadas, mas a ciclosporina também tem sido pesquisada. Cristofanilli et al. (2001) demonstraram que a ciclosporina foi capaz de controlar a proliferação celular, induzindo apoptose *in vitro*, o que sugere que a ciclosporina pode ser uma droga útil na terapia antifibrose pós-trabeculectomia.

A ciclosporina atua inibindo a transição genética de algumas interleucinas (IL-2, IL-3, IL-4 e IL-6) e do interferon γ , modulando a resposta imune. Sua ação também afeta células não-imunes, como células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos e mastócitos. Estudos recentes demonstraram que a ciclosporina induz a redução na proliferação de fibroblastos na mucosa conjuntival de coelhos (Leonardi et al., 2001; Kunert et al., 2002). Esta ação de inibição nos fibroblastos, nas células endoteliais e em células inflamatórias como os mastócitos, explica a menor área de fibrose, de vascularização e de infiltrado inflamatório encontrada tanto no grupo da ciclosporina isolada quanto no grupo da associação da ciclosporina à prednisolona.

Devido a estas propriedades, a ciclosporina poderia ser utilizada também como antifibrótico na trabeculectomia. Turacli et al (1996), num estudo prospectivo e randomizado, sugeriram que a ciclosporina é uma droga efetiva e segura como agente antimetabólico na TREC. O mesmo grupo de pesquisadores também realizou outro estudo comparando os efeitos da mitomicina e da ciclosporina, avaliando 86 pacientes (30 no grupo da mitomicina, 28 no grupo da ciclosporina e 28 no grupo controle). A PIO foi controlada nos dois grupos de tratamento (mitomicina e ciclosporina), com taxas similares de sucesso (90% e 87,5%, respectivamente), sugerindo que a ciclosporina também pode ser usada como agente antimetabólico na trabeculectomia, com menor índice de complicações.

Já os corticóides inibem a resposta inflamatória por diferentes vias, sendo que uma das principais é pelo bloqueio da enzima fosfolipase, que

impede a conversão dos fosfolipídios de membrana em ácido aracdônico e, posteriormente, em leucotrienos e prostaglandinas (fatores quimiotáticos que atraem células inflamatórias). Essa redução dos mediadores inflamatórios, somada a redução na permeabilidade vascular também causada pela droga, reduz a concentração de linfócitos, monócitos e basófilos, além de diminuir a atividade dos macrófagos no foco inflamatório. Essa cascata de eventos inibe a atividade mitótica, a liberação de fatores de crescimento e a produção de fibrina na lesão, o que culmina com a redução da atividade dos fibroblastos e, assim, do processo de cicatrização (Lama e Fechtner, 2003).

O uso de corticóides no pós-operatório de cirurgias oculares é feito de forma rotineira na maioria dos procedimentos há várias décadas. Os efeitos que comprovam o benefício do seu uso, no entanto, só começaram a ser estudados a partir da década de 80. Estudos que acompanharam pacientes submetidos à TREC por mais de 10 anos demonstraram melhor controle da PIO e dos parâmetros do disco óptico e campo visual naqueles que utilizaram corticóides tópicos por longos períodos (Lama e Fechtner, 2003).

Estudos posteriores começaram a investigar a eficácia dos corticóides na reação inflamatória conjuntival presente antes do procedimento cirúrgico, causada pela terapia medicamentosa prévia. Broadway et al. (1994) utilizaram corticóides tópicos no pós-TREC, concluindo que estas drogas foram inefetivas para suprimir a inflamação subclínica causada pela terapia antiglaucoma a qual os pacientes já estavam sendo submetidos. O mesmo grupo de pesquisadores, no entanto, dois anos depois, utilizou um protocolo prévio à TREC de corticoterapia tópica (fluorometolona 1%) e observou

redução significativa no número de macrófagos e linfócitos no epitélio conjuntival, e de macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos na substância própria da conjuntiva, mesmo já havendo inflamação subclínica já instalada pela terapia antiglaucoma (Broadway et al., 1996). Uma vez que os efeitos anti-proliferativos dos corticóides demoram a ocorrer, alguns autores recomendam que sua administração deve ser iniciada no pré-operatório, possibilitando melhor ação no pós (Nguyen e Lee, 1992). A prednisolona 1% é uma droga bastante efetiva para este propósito, mas pode, assim como outros corticóides, induzir o desenvolvimento de catarata e de infecções, principalmente ceratites (Lama e Fechner, 2003).

Nosso estudo demonstrou que os parâmetros inflamatórios histomorfométricos (espessura epitelial e diâmetro de vasos sanguíneos) foram menos intensos no tratamento apenas com ciclosporina, quando comparados ao tratamento com prednisolona isolada. O mesmo ocorreu com os parâmetros avaliados por meio de imunoistoquímica (grau de infiltrado inflamatório, fibrose e número de vasos reativos no processo inflamatório). Quando as drogas isoladas foram comparadas com o tratamento de associação de ciclosporina e prednisolona, todos os parâmetros avaliados apresentaram menores médias, o que sugere uma ação sinérgica das drogas para reduzir a resposta inflamatória induzida pela terapia tópica no pós-operatório da trabeculectomia.

CONCLUSÃO

A associação ciclosporina com a prednisolona parece ser mais benéfica que as duas drogas isoladamente. Ela causa maior redução da inflamação, fibrose e vascularização conjuntival pós-cirúrgica no *flap* da TREC, com potencial de manter a fístula de drenagem patente por mais tempo, o que aumenta as chances de sucesso da intervenção.

8. REFERÊNCIAS

Referências Introdução:

1. Addicks EM, Quigley HA, Green WR, Robin AL. Histologic characteristics of filtering blebs in glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol*. 1983;101(5):795-8.
2. Adkins JC, Balfour JA. Brimonidine. A review of its pharmacological properties and clinical potential in the management of open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 1998;12(3):225-41.
3. Alm A, Stjernschantz J. Effects on intraocular pressure and side effects of 0,005% latanoprost applied once daily, evening or morning: a comparison with timolol. Scandinavian Latanoprost Study Group. *Ophthalmology*. 1995;102:1743-1752.
4. Arcieri ES, Santana A, Rocha FN, Guapo GL, Costa VP. Blood-aqueous barrier changes after the use of prostaglandin analogues in patients with pseudophakia and aphakia: a 6-month randomized trial. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123(2): 186-92.
5. Ayyala RS, Cruz DA, Margo CE, Harman LE, Pautler SE, Misch DM. Cystoid macular edema associated with latanoprost in aphakic and pseudophakic eyes. *Am J Ophthalmol*. 1998;126:602-4.

6. Balfour JA, Wilde MI. Dorzolamide. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 1997;10(5):384-403.
7. Baudouin C, Garcher C, Haouat N, Bron A, Gastaud P. Expression of Inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. *Ophthalmology*. 1994;101:454-60.
8. Baudouin C. Mechanisms of failure in glaucoma filtering surgery: a consequence of antiglaucomatous drugs? *Int J Clin Pharmacol Res*. 1996;16(1):29-41.
9. Baudouin C. Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface. *Curr Opin Ophthalmol*. 1996;7(2):80-6.
10. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, Bechetille A. Ocular Surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs. *Ophthalmology*. 1999;106(3):556-63.
11. Becker B, Gage T. Demecarium bromide and echothiophato iodide in chronic glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1960;63:126-31.
12. Berrospi R, Leibowitz HM. Betaxolol: a new beta-adrenergic blocking agent for treatment of glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1982;100(6):43-70.
13. Bito LZ. A new approach to the medical management of glaucoma, from the bench to the clinic, and beyond: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(6):126-33.

14. Bowman Rj, Cope J, Nischal KK. Ocular and systemic side effects of brimonidine 0, 2% eye drops (Alphagan) in children. *Eye*. 2004;18(1): 24-6.
15. Brandt JD, Wittpenn JR, Katz J, Steinmann WN, Spaeth GL. Conjunctival impression cytology in patients with glaucoma using long-term topical medication. *Am J Ophthalmol*. 1991;112(3):297-301.
16. Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. *Arch Ophthalmol*. 1994;112(11):1437-1454.
17. Campbel WB, Halushka PV. Prostaglandins. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G., eds. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York: Mac-Graw Hill;1996. cap 26, p 1126-38.
18. Carlsen JO, Zabriskie NA, Kwon YH, Barbe ME, Scott WE. Apparent central nervous system depression in infants after the use of topical brimonidine. *Am J Ophthalmol* .1999;128(2):255-6.
19. Consenso Brasileiro de Glaucoma de Ângulo Aberto (3:2009). Sociedade Brasileira de Glaucoma. São Paulo-Brasil: Editora PlanMark; 2009.
20. Costa VP, Wilson RP, Azuara-Blanco A. Medical Therapy. In. Azuara-Blanco A, Costa VP, Wilson RP. *Handbook of Glaucoma*. London-United Kingdom: Editora Martin Dunitz Ltda; 2002.p 101-11.

21. Cvetkovic RS, Perry CM. Brinzolamide: a review of its use in the management of primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 2003;20(12):919-47.
22. Fellman RL, Starita RJ. Ocular and systemic side effects of topical cholinergic and anticholinesterase drugs. In: Sherwood MB, Spaeth GL. *Complications of Glaucoma Therapy*. Thorofare, USA: Slack Incorporated: 1990. p 5-18.
23. Fiore PM, Jacobs IH, Goldbert DB. Drug-induced pemphigoid. A spectrum of diseases. *Arch Ophthalmol*. 1987;105(12):1660-5.
24. Gabelt BT, Kaufman PL. Prostaglandin F2 alpha increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res*. 1989; 49:389-402.
25. Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD. The ocular hypertension treatment study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2002;120(6):714-720.
26. Herreras JM, Pastor JC, Calonge M, Asensio VM. Ocular surface alteration after long-term treatment with antiglaucomatous drug. *Ophthalmology*. 1992;99(7):1082-8.
27. Joyce PW, Mills KB, Richardson T, Mawer GE. Equivalence of conventional and sustained release oral dosage formulations of acetazolamide in primary open angle glaucoma. *Br J Clin Pharmacol*. 1989;27(5):597-613.

28. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2002;120(6):701-713.
29. Katz LJ. Brimonidine tartrate 0, 2% twice daily vs timolol 0,5% twice daily: 1-year results in glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*. 1999;127(1):20-6.
30. Kobelt-Nguyen G, Gerdtham UG, Alm A. Costs of treating primary open-angle glaucoma and ocular hypertension: a retrospective, observational two-year chart review of newly diagnosed patients in Sweden and the United States. *J Glaucoma*. 1998 ;7(2):95-104.
31. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. In: *Cornea*. St Louis: Mosby; 1997. chap1:41-47.
32. Lavin MJ, Wormald RPL, Migdal CS, Hitchings RA. The influence of prior therapy on the success of trabeculectomy. *Arch Ophthalmol*. 1990;108(11):1543-8.
33. Leske MC, Heijl A, Hyman L, Bengtsson B. Early Manifest Glaucoma Trial- Design and Baseline Data. *Ophthalmology*. 1999;106(11):2144-53.
34. Lichter P, Musch D, Gillespie BW, Guire KE, Janz NK, Wren PA, Mills RP. Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma

- treatment study comparing initial treatment randomized to medications or surgery. *Ophthalmology*. 2001;108(11):1943-53.
- 35.Lima MC, Paranhos Júnior A, Salim S, Honkanen R, Devgan L, Wand M et al. Visually significant cystoid macular edema in pseudophakic and aphakic patients with glaucoma receiving latanoprost. *J Glaucoma*, 2000;9(4):317-21.
- 36.Linden C. Therapeutic potential of prostaglandin analogues in glaucoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(4):679-94.
- 37.McMahon CD, Shaffer RN, Hoskins HD, Hetherington J Jr. Adverse effects experienced by patients taking timolol. *Am J Ophthalmol*. 1979,88(4):736-41.
- 38.Melamed S, David R. Ongoing clinical assessment of the safety profile and efficacy of brimonidine compared with timolol:year-three results. Brimonidine Study Group II. *Clin Ther*. 2000;22(1):103-11.
- 39.Mietz H, Shlotzer-Schrehardt U, Strassfeld C, Krieglstein GK. Effect of latanoprost and timolol on the histopathology of the rabbit conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(3):679-687.
- 40.Musch DC, Lichter PR, Guire KE, Standardi CL.The Collaborative Initial Glaucoma Study: study design, methods, and baseline characteristics of enrolled patients. *Ophthalmology*. 1999;106(4):653-62.

41. Nilsson SF, Samuelsson M, Bill A, Stjernschantz J. Increased uveoscleral outflow as a possible mechanism of ocular hypotension caused by prostaglandin F₂ alpha-1-isopropylester in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res.* 1989;48(5):707-16.
42. Novak GD. Ophthalmic beta-blockers since timolol. *Surv Ophthalmol* 1987;31(5):307-27.
43. Nuzzi R, Vercelli A, Finazzo C, Cracco C. Conjunctival and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1995;233(3):154-62.
44. Ocklind A. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res.* 1998;67(2):179-91.
45. Olthoff CM, Schouten JS, van de Borne BW, Webers CA. Noncompliance with ocular hypotensive treatment in patients with glaucoma or ocular hypertension an evidence-based review. *Ophthalmology.* 2005 ;112(6):953-61.
46. Patel SC, Spaeth GL. Compliance in patients prescribed eyedrops for glaucoma. *Ophthalmic Surg.* 1995 ;26(3):233-6. PubMed PMID: 7651690.

47. Povoá CA, Nicolela MT, Valle ALSL, Gomes LES, Neustein I. Prevalência de glaucoma identificada em campanha de detecção em São Paulo. *Arq Bras Oftalmol*. 2001;64(4):303-7.
48. Prata Junior JA, Reys JC. Uso prolongado de colírios antiglaucomatosos e eficácia da trabeculectomia. *Arq Bras Oftalmol*. 1993;56(2):97-101.
49. Quigley HA, Vitale S. Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:83-91.
50. Radius RL, Diamond GR, Polak IP, Langham ME. Timolol: a new drug for management of chronic simple glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1978;96(6):1003-10.
51. Reiss GR, Brubaker RF. The mechanism of betaxolol: a new ocular hypotensive agent. *Ophthalmology*. 1983;90:1369-73.
52. Resnikoff S, Pascolini D, Etyale D, Kocur I, Pararajasegaram, Pokharel G e Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organization*. 2004;82(11):844-851.
53. Sakata K, Sakata LM, Sakata VM, et al. Prevalence of glaucoma in a South Brazilian population: Projeto Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;(48):4974-4979.

54. Sagara T, Gatton DD, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL, Weinreb RN. Topical prostaglandin F2 alpha treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. *Arch Ophthalmol.* 1999;117(6):794-801.
55. Scarpi M. Olho Seco. In: Belfort Jr R, Kara-José N..*Córnea-Clinica e Cirúrgica.* São Paulo: Roca; 1996. Cap 25:285-299.
56. Shields MB. Cholinergic Stimulators. In: M. Bruce Shields. *Textbook of glaucoma*, 4th edition. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins; 1998. Chap.25:384-97.
57. Shields MB. Adrenergic stimulators. In: M. Bruce Shields. *Textbook of glaucoma*, 4th edition. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins; 1998. Chap 26:398-412.
58. Silver LH. The brinzolamide Primary Therapy Study Group. Clinical efficacy and safety of brinzolamide, a new topical carbonic anhydrase inhibitor for primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *Am J Ophthalmol.* 1998;126(3):400-8.
59. Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(12):1655-9.
60. Strahlman E, Tipping R, Vogel R. The International Dorzolamide Study Group. A double-masked, randomized, 1-year study comparing dorzolamide, timolol, and betaxolol. *Arch Ophthalmol.* 1995;113(8):1009-16.

61. Tamm E, Rittig M, Lutjen-Drecoll E. Electron microscopy and immunohistochemical studies of the intraocular pressure lowering effect of prostaglandin F₂ alpha. *Fortschr Ophthalmol.* 1990;87(6):623-9.
62. Tauber J, Melamed S, Foster CS. Glaucoma in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology.* 1989;96(1):33-7.
63. Tezel G, Siegmund KD, Trinkaus K, Wax MB, Kass MA, Kolker AE. Clinical factors associated with progression of glaucomatous optic disc damage in treated patients. *Arch Ophthalmol.* 2001;119(6):813-8.
64. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The Relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The Agis Investigators. *Am J Ophthalmol.* 2000;130(4):429-440.
65. Thygesen J, Aaen K, Theodorsen F, Kessing SV, Prause JU. Short-term effect of latanoprost and timolol eye drops on tear fluid and the ocular surface in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Acta Ophthalmol Scand.* 2000;78(1):37-44.
66. Thylefors B. A global initiative for the elimination of avoidable blindness. *Am J Ophthalmol.* 1998;125(1):90-93.
67. Toris CB, Yablonski ME, Wang YL, Hayashi M. Prostaglandin A₂ increases uveoscleral outflow and trabecular outflow facility in the cat. *Exp Eye Res.* 1995;61(6):649-57.

68. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology*. 1985;92(6):728-733.
69. Tsukamoto H, Noma H, Mukai S, Ikeda H, Mishima HK. The efficacy and ocular discomfort of substituting brinzolamide for dorzolamide in combination therapy with latanoprost, timolol, and dorzolamide. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2005;21(5):395-9.
70. Van Buskirk EM. Corneal anesthesia after timolol maleate therapy. *Am J Ophthalmol* 1979;88(4):739-43.
71. Weinreb RN, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Tsukahara S, Lindsey JD. Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:(13):2772-80.
72. Weissman SS, Asbell PA. Effects of topical timolol (0,5%) and betaxolol (0,5%) on corneal sensitivity. *Br J Ophthalmol*.1990;74(7):409-14.
73. Wilhelmus KR, Huang AJW, Hwang DG, Parrish CM, Sutphin Jr JE, Whitsett JC. Surgical Procedures of the ocular surface. In: The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. *Basic and Clinical Science Course: External Disease and Cornea*. San Francisco-CA. 2000-2001. 549p:(12):392-408.

74. Williams DE, Nguyen KD, Shapourifar-Tehrani S. Effects of timolol, betaxolol and levobunolol on human Tenon fibroblasts in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(7):2233-40.
75. Zimmerman TJ, Kaufman HE. Timolol: a beta-adrenergic blocking agent for the treatment of glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1977;95(4):601-4.

Referências do Artigo 01:

76. Quigley, H. A. Neuronal Death In Glaucoma .*Prog Retin Eye Res.* V.18, N.1, P.39-57, 1998.
77. Filho, J. P. S.; Dias, A. B. T.; Filho, A. A. S. L.; Sartori, M. F.; Martins, M. C. A Evolução Do Mercado Farmacêutico Brasileiro No Tratamento Do Glaucoma Nos Últimos 30 Anos. *Arq Bras Oftalm.* V.66, N.6, P.811-817, 2003.
78. Brubaker, R. F. Mechanism Of Action Of Bimatoprost (Lumigantm). *Surv Ophthalmol.* V.45, N.4, P.347-351, 2001.
79. Parrish, R.K.; Palmberg, P.; Sheu, W.P. A Comparison Of Latanoprost, Bimatoprost, And Travoprost In Patients With Elevated Intraocular Pressure: A 12-Week, Randomized, Masked-Evaluator Multicenter Study. *Am J Ophthalmol.* V.135, N.5, P.688-703, 2003.

80. Linden C. Therapeutic Potential Of Prostaglandin Analogues In Glaucoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001; 10(4): 679-94.
81. Leal, B.C.; Medeiros, F. A.; Medeiros, F. W.; Santo, R. M.; Susanna, R. Conjunctival Hyperemia Associated With Bimatoprost Use: A Histopathologic Study. *Am J Ophtalmol*.V.138, N.2, P.310-313, 2004.
82. Jaanus, S. D. New Medical Therapies For Glaucoma. *Clin Eye Vision Care*. V.9, N.3, P.131-133, 1997.
83. Kook, M. S.; Lee, K. Increased Eyelid Pigmentation Associated With Use Of Latanoprost. *Am J Ophthalmol*.V.129, N.6, P.804-806, 2000.
84. Pfeiffer, N.; Grieserson, I.; Goldsmith, H.; Hochgesand, D.; Winkgen-Böhres, A.; Appleton, P. Histological Effects In The Iris After 3 Months Of Latanoprost Therapy: The Mainz 1 Study. *Arch Ophthalmol*.V.119, N.2, P.191-196, 2001.
85. Alm, A.; Grierson, I.; Shields, M. B. Side Effects Associated With Prostaglandin Analog Therapy. *Surv Ophthalmol*.V.53, N.1, P.93-105, 2008.

86. Broadway, D.C.; Grierson, I.; O'Brien, C.; Hitchings, R.A. Adverse Effects Of Topical Antiglaucomamedication I. The Conjunctival Cell Profile. *Arch Ophthalmol.* V.112, N.11, P.1437-1445, 1994.
87. Brandt Jd, Wittpenn Jr, Katz J, Steinmann Wn, Spaeth Gl. Conjunctival Impression Cytology In Patients With Glaucoma Using Long-Term Topical Medication. *Am J Ophthalmol.* 1991; 112:297-301.
88. Baudouin, C.; Pisella, P.J.; Fillacier, K.; Goldschild, M.; Becauet, F.; De Saint Jean, M.; Béchetuille, A. Ocular Surface Inflammatory Changes Induced By Topical Antiglaucoma Drugs. *Ophthalmology.* V.106, N.3, P.556-563, 1999.
89. Pisella, P. J.; Debbasch, C.; Pascale, H.; Creuzot-Garcher, C.; Rat, P.; Brignole, F.; Baudouin, C. Conjunctival Proinflammatory And Proapoptotic Effects Of Latanoprost And Preserved And Unpreserved Timolol: An Ex Vivo And In Vitro Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V.45, N.5, P.1360-1368, 2004.
90. Baudouin, C.; Liang, H.; Hamard, P.; Riancho, L.; Creuzot-Garcher, C.; Warnet, J. M.; Brignole-Baudouin, F. The Ocular Surface Of Glaucoma Patients Treated Over The Long Term Expresses Inflammatory Markers Related To Both T-Helper 1 And T-Helper 2 Pathways. *Ophthalmology.* V.115, N.1, P.109-115, 2008.

91. Russ, H.H.A.; Costa, V.P.; Ferreira, F.M.; Valgas, S.R.; Neto, M.A.C.; Strobel, E.L.; Truppel, J.H. Conjunctival Changes Induced By Prostaglandin Analogues And Timolol Maleate: A Histomorphometric Study. *Arq Bras Oftalmol.* V.70, N.6, P.910-916, 2007.
92. Bacha Jr, W. J.; Wood, L. M. Principios Generales De Histologia. In.: Bacha Jr, W. J.; Wood, L. M. Atlas Color Atlas Of Veterinary Histology. 1a. Ed. Buenos Aires: Intermédica. 1991, P.1-8.
93. Mietz, H.; Schlötzer-Schrehardt, U.; Strassfeld, C.; Krieglstein, G. K. Effect Of Latanoprost And Timolol On The Histopathology Of The Rabbit Conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*V.42, N.3, P.679-687, 2001.
94. Shimazaki, J.; Hanada, K.; Yagi, Y.; Yamagami. J.; Ishioka, M.; Shimmura, S.; Tsubota, K. Changes In Ocular Surface Caused By Antiglaucoma Eyedrops: Prospective, Randomized Study For The Comparison Of 0,5% Timolol V. 0,12% Unoprostone. *Brit J Ophthalmol.*V.84, N.11, P. 1250-1254, 2000.
95. Novaes, P.; Saldiva, P. H. N.; Kara, J. N.; Macchione, M.; Matsuda, M.; Racca, L.; Berra, A. Ambient Levels Of Air Pollution Induce

Goblet-Cell Hyperplasia In Human Conjunctival Epithelium. Environmental Health Perspectives.V.115, N.12, P.1753-1756, 2007.

96.Guenoun, J. M.; Baudouin, C.; Rat, P.; Pauly, A.; Warnet, J.M.; Baudouin, F. B. In Vitro Study Of Inflammatory Potential And Toxicity Profile Of Latanoprost, Travoprost And Bimatoprost In Conjunctival-Derived Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci.V.46, N.7, P. 2444-2450, 2005.

97.Guenoun, J. M.; Baudouin, C.; Rat, P.; Pauly, A.; Warnet, J.M.; Baudouin, F. B. In Vitro Comparison Of Citoprotective And Antioxidative Effects Of Latanoprost, Travoprost And Bimatoprost In Conjunctival-Derived Epithelial Cells. Invest Ophthalmol. Vis Sci.V.46, N.12, P.4594-4599, 2005.

98.Cvenkel, B.; Ihan, A. Ocular Surface Changes Induced By Topical Antiglaucoma Monotherapy. Ophthalmologica. V.216, N.3, P.175-179, 2002.

Referências do artigo 02:

99.Addicks, E. M.; Quigley, H.A.; Green, W.R.; Robin, A. L. Histologic Characteristics Of Filtering Blebs In Glaucomatous Eyes. Arch Ophthalmol. V.101, N.5, P.795-8, 1983.

100. Bacha Jr, W. J.; Wood, L. M. Principios Generales De Histologia. In.: Bacha Jr, W. J.; Wood, L. M. Atlas Color De Histologia Veterinaria. 1a. Ed. Buenos Aires: Intermédica. 1991, P.1-8.
101. Baudouin, C.; Garcher, C.; Haouat, N.; Bron, A.; Gastaud, P. Expression Of Inflammatory Membrane Markers By Conjunctival Cells In Chronically Treated Patients With Glaucoma. Ophthalmology. V.101, N.3, P.454-460, 1994.
102. Baudouin, C.; Pisella, P.J.; Fillacier, K.; Goldschild, M.; Becauet, F.; De Saint Jean, M.; Béchetoille, A. Ocular Surface Inflammatory Changes Induced By Topical Antiglaucoma Drugs. Ophthalmology. V.106, N.3, P.556-563, 1999.
103. Bensoussan, L.; Blondin, C.; Baudouin, C.; Hamard, P.; Sabeh Afaki, G.; Creuzot-Garcher, C.; Et Al. [Flow Cytometric Analysis Of Hla-Dr, Il-6 And Il-8 Expression By Conjunctival Epithelial Cells From Patients With Prolonged Topical Antiglaucoma Treatments]. J Fran D'Ophthalmol. V.26, N.8, P.782-789, 2003.
104. Bindlish, R.; Condon, G.P.; Schlosser, J.D.; D'antonio, J.; Lauer, K.B.; Lehrer, R. Efficacy And Safety Of Mitomycin-C In Primary Trabeculectomy: Five-Year Follow-Up. Ophthalmology. V.109, N.7, P.1336-1341, 2002.

105. Brandt, J. D.; Wittpenn, J. R.; Katz, L. J.; Steinmann, W.N.; Spaeth, G. L. Conjunctival Impression Cytology In Patients With Glaucoma Using Long-Term Topical Medication. *Am J Ophthalmol.* V.112, N.3, P.297-301,1991.
106. Broadway, D. C.; Grierson, I.; O'Brien, C.; Hitchings, R. A. Adverse Effects Of Topical Antiglaucoma Medication. I. The Conjunctival Cell Profile. *Arch Ophthalmol.* V.112, N.11, P.1437-1445, 1994¹.
107. Broadway, D.C.; Grierson, I.; O'Brien, C.; Hitchings, R. A. Adverse Effects Of Topical Antiglaucoma Medication. Ii. The Outcome Of Filtration Surgery. *Arch Ophthalm.* V.112, N.11, P. 1446-1454, 1994. Comment In: *Arch Ophthalmol.* V.113, N.7, P.849-850, 1994².
108. Broadway, D.C.; Grierson, I.; Stürmer, J.; Hitchings, R.A. Reversal Of Topical Antiglaucoma Medication Effects On The Conjunctiva. *Arch Ophthalmol.* V.114, N., P.262-267, 1996.
109. Cristofanilli, M.; Pescosolido, N.; Risuleo, G.; Scarsella, G. A Murine Cell Culture Model For Post-Trabeculectomy Antifibrotic Treatment: Induction Of Apoptosis By Cyclosporin. *Acta Ophthalmol Scan.* V.79, N.3, P. 309-312, 2001.

110. De Saint Jean, M.; Brignole, F.; Bringuier, A. F.; Bauchet, A.; Feldmann, G.; Baudouin, C. Effects Of Benzalkonium Chloride On Growth And Survival Of Chang Conjunctival Cells. *Inv Ophthalmol Vis Sci* V.40, N.3, P. 619-630, 1999.
111. Gordon, M.O.; Beiser, J.A.; Brandt, J.D.; Heuer, D.K.; Higginbotham, E. J.; Johnson, C. A.; Et Al. The Ocular Hypertension Treatment Study: Baseline Factors That Predict The Onset Of Primary Open-Angle Glaucoma. *Arch Ophthalmol*. V.120, N.6, P. 714-720, 2002. Comment In: *Arch Ophthalmol*. V.122, N.7, P.1088-1089, Author Reply 1089, 2004.
112. Fontana, H.; Nouri-Mahdavi, K.; Lumba, J.; Ralli, M.; Caprioli, J. Trabeculectomy With Mitomycin C: Outcomes And Risk Factors For Failure In Phakic Open-Angle Glaucoma. *Ophthalmology*. V.113, N.6, P.930-936, 2006.
113. Francis, B. A.; Du, L. T.; Najafi, K.; Murthy, R.; Kurumety, U.; Rao, N.; Minckler, D. S. Histopathologic Features Of Conjunctival Filtering Blebs. *Arch Ophthalmol*. V.123, N.2, P.166-170, 2005.
114. Herreras, J. M.; Pastor, J. C.; Calonge, M.; Asensio, V. M. Ocular Surface Alteration After Long-Term Treatment With

- Antiglaucomatous Drug. *Ophthalmology*. V.99, N.7, P.1082-1088, 1992. Comment In: *Ophthalmology*. V.100, N.3, P.293-294, 1993.
115. Kunert, K. S.; Tisdale, A. S.; Gipson, H. K. Goblet Cell Number And Epithelial Proliferation In The Conjunctiva Of Patients With Dry Eye Syndrome Treated With Cyclosporine. *Arch Ophthalmol*. V.120, N.3, P.330-337, 2002.
116. Lama, P. J.; Fechtner, R. D. Antifibrotics And Wound Healing In Glaucoma Surgery. *Surv Ophthalmol*. V.48, N.3, P.314-346, 2003.
117. Lavin, M. J.; Wormald, R. P.; Migdal, C. S.; Hitchings, R. A. The Influence Of Prior Therapy On The Success Of Trabeculectomy. *Arch Ophthalmol*. V.108, N.11, P.1543-1548, 1990.
118. Leonardi, A.; Defranichis, G.; Fregona, I. A.; Violato, D.; Plebani, M.; Secchi, A. G. Effects Of Cyclosporin A On Human Conjunctival Fibroblasts. *Arch Ophthalmol*. V.119, N.10, P.1512-1517, 2001.
119. Moura, C. R.; Mello, P. A. A. Tratamiento Quirúrgico De Glaucoma. In: Mello, P.A. A. Glaucoma. 1a. Ed, Quito: Noción, 1999, P.201-221.

120. Mietz, H.; Niesen, U.; Krieglstein, G. K. The Effect Of Preservatives And Antiglaucomatous Medication On The Histopathology Of The Conjunctiva. *Graefe's Arch Clini Exp Ophthalmol.* V.232, N.9, P.561-565, 1994.
121. Mietz, H.; Jacobi, P.C.; Welsandt, G.; Krieglstein, G. K. Trabeculectomies In Fellow Eyes Have An Increase Risk Of Tenon's Capsule Cysts. *Ophthalmology.* V.109, N.5, P.992-997, 2002.
122. Nguyen, K. D.; Lee, D. A. Effects Of Steroids And Nonsteroidal Antiinflammatory Agents On Human Ocular Fibroblast. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V.33, P.2693-2701, 1992.
123. Pfeiffer, N.; Grieserson, I.; Goldsmith, H.; Hochgesand, D.; Winkgen-Böhres, A.; Appleton, P. Histological Effects In The Iris After 3 Months Of Latanoprost Therapy: The Mainz 1 Study. *Arch Ophthalmol.* V.119, N.2, P.191-196, 2001.
124. Ritch, R.; Shields, B.; Krupin, T. Pharmacology. In: Ritch R, Shields Mb, Krupin T. *The Glaucomas.* 2^a Ed. St. Louis: Mosby, 1996, Vol.3, P.1375-1489.
125. Russ, H. H.; Costa, V. P.; Ferreira, F. M.; Valgas, S. R.; Correa Neto, M.A.; Strobel, E. L.; Truppel, J. H. Conjunctival Changes

Induced By Prostaglandin Analogues And Timolol Maleate: A Histomorphometric Study. *Arq Bras Oftalmol.* V. 70, N.6, P.910-916, 2007.

126. Sherwood, M. B.; Grierson, I.; Millar, L.; Hitchings, R. A. Long-Term Morphologic Effects Of Antiglaucoma Drugs On The Conjunctiva And Tenon's Capsule In Glaucomatous Patients. *Ophthalmology.* V.96, N.3, P.327-335, 1989.
127. Susanna Junior, R.; Medeiros, F. A. Trabeculectomia. In: Susanna Junior, R. *Cirurgia Do Glaucoma.* 2ª Ed. São Paulo: Rocca, 2002, P.27-64.
128. Khaw, Peng T; Chang, Lydia; Wong, Tina T; Mead, Anna ; Daniels, Julie T. ; Cordeiro, M. Francesca. Modulation Of Wound Healing After Glaucoma Surgery. *Curr Op Ophthal:* April 2001 – V. 12 – I. 2 - Pp 143-148 Glaucoma
129. 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.
130. Turacli, M. E.; Gunduz, K.; Aktan, G.; Sencer, H. Topical Cyclosporine As A Possible New Antimetabolite In Trabeculectomy. *Ophthalm Surg Lasers.* V.27, N.6, P.438-444, 1996.

131. Turacli, M. E.; Gunduz, K.; Aktan, G.; Tamer, C. A Comparative Clinical Trial Of Mitomycin C And Cyclosporine A In Trabeculectomy. *Eur J Ophthalmol.* V.6, N.4, P.398-401, 1996.
132. Vijava, L.; Mukhesh, B. N.; Shanta, B.; Ramalingam, S.; Sathi Devi, A. V. Comparison Of Low Dose Intraoperative Mitomycin-C Vs 5-Fluorouracil In Primary Glaucoma Surgery: A Pilot Study. *Ophthalmic Surg Lasers.* V.31, N.1, P.24-30, 2000.
133. Wudunn, D.; Cantor, L. B.; Palanca-Capistrano, A. M.; Hoop, J.; Alvi, N. P.; Finlev, C.; Lakhani, V.; Burnstein, A.; Knotts, S. L. Long-Term Outcomes Of Intraoperative 5-Fluorouracil Versus Intraoperative Mitomycin C In Primary Trabeculectomy Surgery. *Am J Ophthalmol.* V.134, N.4, P.521-528, 2002.
134. Young, L.T.; Higginbotham, E. J.; Zou, X. L.; Farber, M. D. Effects Of Topical Glaucoma Drugs On Fistulized Rabbit Conjunctiva. *Ophthalmology.* V.97, N.11, P.1423-1427, 1990.

9. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que, em relação às conseqüências do uso de combinações fixas de análogos de prostaglandinas com maleato de timolol na conjuntiva de coelhos:

1. Observou-se presença de reação inflamatória conjuntival difusa com predomínio de monomorfonucleares em todos os grupos submetidos a tratamento com as associações.

2. Houve aumento do número de células calciformes inicialmente no grupo tratado com associação de bimatoprost com maleato de timolol.

3. O grupo tratado com latanoprost + timolol apresentou maior espessura do epitélio conjuntival quando comparado aos outros grupos.

4. Observou-se na avaliação da conjuntiva no pós-operatório de glaucoma que os parâmetros inflamatórios histomorfométricos (espessura epitelial e diâmetro de vasos sangüíneos) foram melhor controlados no grupo tratado com a associação de drogas, quando comparados ao tratamento com prednisolona e ciclosporina isoladas. O mesmo ocorreu com os parâmetros avaliados por meio de imunistoquímica (grau de infiltrado inflamatório, fibrose e número de vasos reativos no processo inflamatório).

Retina

Apesar do surgimento de drogas novas com efeito minimizador de agressão à conjuntiva, o tratamento do glaucoma é crônico, levando a alterações persistentes na superfície ocular. Em virtude das alterações conjuntivais demonstradas nestes estudos, justificam-se continuidade dessas avaliações para melhor acompanhamento e manejo cirúrgico do paciente glaucomatoso.

10. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação da Comissão de Ética



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 038/2008, referente ao projeto “Alterações conjuntivas induzidas por combinações de análogos de prostaglandinas e maleato de timolol: estudo histomorfométrico e imunohistoquímico”, sob a responsabilidade de Palloma Rose, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 13 de outubro de 2008. Este certificado expira em 13 de outubro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 038/2008, regarding the project “Conjunctival changes induced by prostaglandin analogues and timol maleate: histomorphometric and immunohistochemical study”, in charge of Palloma Rose, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on October 13, 2008. This certificate expires on October, 2009.

Curitiba, 13 de outubro de 2008.


Rogério Ribas Lange
Presidente


Fabiano Montiani Ferreira
Vice-Presidente

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

11. APÊNDICE

**Apêndice 01: Abstract Apresentado no Congresso da ARVO
(Association For Research in Vision and Ophthalmology) 2009**

Conjunctival Changes Induced by Fixed Combinations of Prostaglandin Analogues and Timolol Maleate: A Histomorphometric Study.

Program Number: 3160

Session Number: D615

Purpose: To compare histological changes induced by antiglaucoma fixed combinations in the rabbit conjunctiva. **Methods:** 30 New Zealand female rabbits with similar age and weight were divided in 3 groups of 10 animals each. The right eyes were treated with one daily drop of timolol maleate 0.5% associated with bimatoprost 0.03% (Ganfort® - Allergan), travoprost 0.004% (Duo-Travatan® - Alcon) and latanoprost 0.005% (Xalacom® - Pharmacia Pfizer) for 30 days. The left eyes served as controls and did not receive medication. Then all rabbits were euthanized, the eyes were enucleated and immediately fixed with 10% formaldehyde for 24 hours, stained with HE and PAS and then evaluated by light microscopy. Morphohistometric analyses were made using the Image Pro-Plus 4.5 software. The parameters evaluated were: conjunctival numbers of inflammatory cells and goblet cells. One-way ANOVA with a significance level of 5% followed by Tukey-Kramer

post hoc tests were used to analyze numerical variables. **Results:** At the 30th day post treatment, all groups exhibited a rather diffuse inflammatory infiltrate, composed by lymphocytes and neutrophils. A baseline low level infiltration, consisting of localized clusters cells was observed in the subepithelial connective tissue of most of the control eyes. There was, however, no significant change in the inflammatory cell numbers comparing all groups studied. A significant increase in number of goblet cells in all treated eyes compared to control eyes ($P=0.002$) was seen. The goblet cell density significantly increased ($P=0.012$) in eyes treated with bimatoprost + timolol maleate compared to latanoprost + timolol maleate. There was no significant difference between bimatoprost + timolol maleate and travoprost + timolol maleate, neither between latanoprost + timolol maleate and travoprost + timolol maleate. **Conclusions:** A change from focal to diffuse inflammatory cell infiltrate was seen in all treated eyes. An increase in goblet cell numbers was seen with the use of all fixed combinations of timolol maleate + prostaglandin analogues compared to control, not-treated eyes. Bimatoprost + timolol maleate significantly increased goblet cell numbers more than the others combinations.

**Apêndice 02: Abstract Apresentado no Congresso da ARVO
(Association For Research in Vision and Ophthalmology) 2010**

Conjunctival Changes Induced by Fixed Combinations of Prostaglandin Analogues and Timolol Maleate: An Immunohistochemical Study

Program Number: 3160

Session Number: 354

Purpose: To compare immunohistochemical changes induced by antiglaucoma fixed combination therapies. **Methods:** 30 New Zealand rabbits were divided in 3 groups of 10 animals. The left eyes were treated with one daily drop of timolol maleate 0.5% associated with bimatoprost 0.03% (Ganfort® - Allergan), travoprost 0.004% (Duo-Travatan® - Alcon) and latanoprost 0.005% (Xalacom® - Pharmacia Pfizer) for 30 days. The right eyes served as controls. All rabbits were euthanized, enucleated and fixed with 10% formaldehyde for 24 hours. The material were processed for immunohistochemistry using anti-factor VIII and anti-actin antibodies and then evaluated by light microscopy. IHC images were analyzed by the Image Pro-Plus 4.5 software. Parameters evaluated were: number of reactive blood vessels to factor VIII and qualitative evaluation of fibroblasts labeled for actin. The scores for fibrosis were classified from minimum to severe. One-way ANOVA with significance level of 5% followed by Tukey-Kramer *post hoc* tests were used to analyze numerical variables (factor VIII). The evaluation of

the ordinal categorical variables (actin-labelling) was performed by means of analysis descriptive statistics and Fischer Exact Test. Results: A significant increase in factor VIII-labeled blood vessels was observed in eyes treated with latanoprost+timolol (5.56 ± 1.6 ; $P=0.004$) and bimatoprost+timolol (4.5 ± 1.6 ; $P=0.046$). The increase was significant higher in eyes latanoprost+timolol compared to travaprost+timolol ($P=0.018$). Conversely in eyes treated with travaprost+timolol a trend towards a higher intensity of actin-labeling was seen, followed by bimatoprost+timolol and lastly by latanoprost+timolol. Conclusions: All fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol caused a certain degree of conjunctival inflammatory response, either by provoking a degree of subendotelial fibrosis or an increase in numbers of reactive blood vessels. Eyes treated with latanoprost+timolol showed a greater number of reactive blood vessels. The degree of fibrosis was more intense in eyes treated with the association of travaprost+timolol.

**Apêndice 03: Abstract Apresentado no Congresso da ARVO
(Association For Research in Vision and Ophthalmology) 2011**

Conjunctival Changes Induced by Prostaglandin Analogues, Timolol Maleate and Fixed Combinations of Prostaglandin Analogues + Timolol Maleate: A Comparative Histomorphometric and Immunohistochemical Study

Program Number: 3111

Session Number: A127

Purpose: To compare histological and immunohistochemical (IHC) changes induced by prostaglandin analogues, timolol maleate and fixed combinations of antiglaucoma drugs on rabbit conjunctiva.

Methods: 70 New Zealand female rabbits with similar age and weight were divided in 7 groups of 10 animals. The left eyes were treated with one daily drop of one of the following drugs: bimatoprost 0.03% (Lumigan® - Allergan), travoprost 0.004% (Travatan® -Alcon), latanoprost 0.005% (Xalatan® -Pfizer), timolol maleate (Timoptic-XE® -MSD) 0.,5%, timolol maleate 0.5%+bimatoprost 0.03% (Ganfort® -Allergan), timolol maleate 0.,5%+travoprost 0.004% (Duo-Travatan® -Alcon) and timolol maleate 0.,5%+latanoprost 0.005% (Xalacom® -Pfizer) for 30 days. The right eyes served as controls. Following euthanasia, theAll rabbits were euthanized.

The conjunctiva was immediately fixed with 10% formaldehyde for 24 hours. Then, samples were routinely processed and stained with HE. Samples were processed for immunohistochemistry using a panel of antibodies: anti-RAM 11 (histiocytes), antibody anti-CD45 (T lymphocytes), CD74 (B lymphocytes), VCAM (endothelial cells and fibroblasts) (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, U.S.A.) at the dilution 1:100 (specifically labels rabbit histiocytes) and then evaluated by light microscopy under a magnification 400x. Images were captured, histomorphometric and immunohistochemical analysis were made using the Image Pro-Plus 4.5 software. The parameters evaluated were: inflammatory reaction, epithelial thickness, number of vessels, vascular diameter and number of goblet cells.. The IHQ evaluated number of histiocytes (RAM 11 – labeled cells), mature T linfocites (CD45), B linfocites (CD74), endothelial and fibrobasts cells (VCAM). One-way ANOVA with a significance level of 5% followed by Tukey-Kramer *post hoc* tests were used to analyze all numerical variables.

Results: All groups of fixed combination presented a significant increase of the inflammatory cell compared to respective isolated prostaglandin: Duo-Travatan x Travatan (DT/T) ($p=0.03$), Ganfort x Lumigan (G/L) ($p=0.02$) and Xalacom x Xalatan (XC/X) ($p=0.04$). All of them had epithelial thickness increase (DT/T) ($p=0.0004$), G/L ($p=0.04$) and XC/X ($p<0.0001$) and also increased the number of blood vessels: (DT/T) ($p=0.009$), G/L($p=0.02$) and XC/X ($p=0.04$). None of them induced significanttive changes in vascular diameter. Only Ganfort induced an increase in the number of goblet cells compareding to Lumigan. ($p=0.025$). The IHQ results showed significanttive

increase of CD45 in all drugs (DT/T $p=0.04$, G/L $p<0.0001$ and XC/X $p=0.0014$) and VCAM increased in G/L ($p<0.0001$) and XC/X ($p=0.04$). Only Duo-travatan compared to Travatan induced increase of expression of RAM 11 ($p=0.0002$). None of them induced expression of CD74. Comparing fixed combinations to timolol, Duotravatan and Ganfort induced increase of inflammatory cells ($p=0.04$ and $p=0.02$, respectively) and in the number of goblet cells ($p=0.001$ and $p=0.0006$, respectively). Xalacom induced also increase of epithelial thickness ($p=0.0002$) and vascular diameter ($p=0.04$). Duotravatan induced increase of epithelial thickness ($p=0.01$). None of the all drugs increased the expression of CD45, CD74 and RAM 11. Only Ganfort induced an increase in VCAM expression ($p<0.0001$).

Conclusions: All drugs caused an increase of inflammatory cells and markers in the conjunctiva. Evidence of a T cell mediated related to inflammatory mediated reaction T, characteristic of a chronic inflammation was noted. Isolated prostaglandins analogues are thought to induce fewer reaction than timolol, but this effect is reduced with associated to timolol as fixed combinations. Comparing fixed combination to isolated prostaglandin analogues, almost all inflammatory parameters increased (epithelial thickness, inflammatory cells and number of blood vessels). Vascular diameter changed with Duotravatan and Ganfort increased goblet cells. Expression of CD45 and RAM 11 is known to increase in chronic inflammatory reaction and this was seen in their Ganfort and Duotravatan groups, respectively. Expression of VCAM, which means increases in the fibroblasts and endothelial cells, was observed in the Ganfort group and

that may be implicated in an increase in the number of fibroblasts and endothelial cells. Comparing fixed combinations to timolol, there are fewer differences in all parameters, which agree with corroborating many studies that showed proved the protective effect of prostaglandin analogues to ocular surface changes, which can be lost when these drugs are associated with timolol. Even the lowest exposition to benzalkonium chloride (BAK, a preservative related to drug toxicity) in the fixed combinations, are not enough to keep the benefits of prostaglandins.

**Apêndice 04: Abstract Apresentado no Congresso da ARVO
(Association For Research in Vision and Ophthalmology) 2012**

**Conjunctival Changes Induced by Prostaglandin Analogues and
Fixed Combinations of Prostaglandin Analogues + Timolol
Maleate: A Comparative Histomorphometric and
Immunohistochemical Study.**

Program Number: 4950

Session Number: 459

Purpose: To compare histological and immunohistochemical (IHC) changes induced by prostaglandin analogues and fixed combinations on rabbit conjunctiva.

Methods: 60 New Zealand rabbits were divided in 6 groups of 10 animals. The left eyes were treated with one daily drop of one of the drugs: bimatoprost 0.03%, travoprost 0.004%, latanoprost 0.005%, timolol maleate 0.5%+bimatoprost 0.03% ,timolol maleate 0.5%+travoprost 0.004% and timolol maleate 0.5%+latanoprost 0.005% for 30 days. Following euthanasia and enucleation, the eyes were routinely processed and stained with HE and for IHC using antibodies anti-RAM 11, anti-CD45, CD74, VCAM. Parameters evaluated were: inflammatory reaction, epithelial thickness, number of vessels,

vascular diameter and number of goblet cells. One-way ANOVA with a significance level of 5% followed by Tukey-Kramer *post hoc tests* were used to analyze all numerical variables.

Results: All groups of fixed combination presented a significant increase of the inflammatory cell compared to respective isolated prostaglandin: All of them had increase on epithelial thickness and in the number of blood vessels. Ganfort induced an increase in the number of goblet cells compared to Lumigan ($p=0.025$). The IHQ results showed significant increase of CD45 in all drugs and VCAM increased in G/L ($p<0.0001$) and XC/X ($p=0.04$). Duotravatan compared to Travatan induced increase of expression of RAM 11 ($p=0.0002$). None of them induced expression of CD74. Comparing FC to Duotravatan and Ganfort induced increase of inflammatory cells. Xalacom increased epithelial thickness ($p=0.0002$) and vascular diameter ($p=0.04$). None of the drugs increased the expression of CD45, CD74 and RAM 11. Fixed combination increased all inflammatory parameters.

Conclusions: Comparing fixed combination to isolated prostaglandin analogues, almost all inflammatory parameters increased (epithelial thickness, inflammatory cells and number of blood vessels).



