

**Hayana Marques do Aragão Rangel**



**Avaliação de bolha fistulante antiglaucomatosa em olhos  
de coelhos após administração de Bevacizumabe,  
Acetato de Triancinolona e Mitomicina-C**

**Belo Horizonte  
2017**

**Hayana Marques do Aragão Rangel**



**Avaliação de bolha fistulante antiglaucomatosa em olhos de coelhos após administração de Bevacizumabe, Acetato de Triancinolona e Mitomicina-C**

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

Área de concentração: Cicatrização

Linha de Pesquisa: Fatores Intervenientes na Cicatrização Tecidual

Orientador: Prof. Sebastião Cronemberger

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Ivana Duval de Araújo

**Belo Horizonte  
2017**



## **Universidade Federal de Minas Gerais**

### **Magnífico Reitor**

Prof. Jaime Arturo Ramírez

### **Vice-Reitora**

Prof<sup>a</sup>. Sandra Regina Goulart Almeida

### **Pró-Reitora de Pós-Graduação**

Denise Maria Trombert de Oliveira

### **Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof<sup>a</sup>. Adelina Martha dos Reis

### **Diretor da Faculdade de Medicina**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

### **Vice-Diretor da Faculdade de Medicina**

Prof. Humberto José Alves

### **Coordenador do Centro de Pós-Graduação**

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

### **Chefe do Departamento de Cirurgia**

Prof. Renato Santiago Gomes

### **Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia**

Prof<sup>a</sup>. Helena Becker

### **Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof. Tulio Pinho Navarro

### **Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof<sup>a</sup>. Vivian Resende

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

Prof. Tulio Pinho Navarro (coordenador)

Prof. Vivian Resende (subcoordenadora)

Prof. Agnaldo Soares Lima

Prof. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana-Peixoto

Prof. Renato Santiago Gomes

### **Representante Discente**

Táise Miriam Ramos Mosso

*A DEUS, pelo Seu amor, graça e  
misericórdia sem fim*

*AOS MEUS PAIS, que, sem medir  
esforços, me mostraram O Cami-  
nho e os caminhos da vida*

*A BRUNO, meu amor, pelo apoio  
constante e por ter formado nossa  
linda família*

*A DULCINHA, minha filha, nosso  
maior presente dado pelo Pai...*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

À minha avó Dulce, por ser exemplo de mulher que soube abraçar com maestria vários papéis na vida e plantou, com meu avô Edgar, a sementinha divina em nossa amada família.

Aos meus tios, Deyse e Sérgio, meus “tios-pais”, que sempre estiveram a meu lado para ajudar sem medidas nos momentos mais importantes de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Prof. Sebastião Cronemberger, pela orientação, apoio e confiança no transcorrer do doutoramento.

À Profa. Ivana Duval de Araújo, pela amizade, pelos conselhos de vida e de trabalho, pela disponibilidade em me auxiliar nesta etapa acadêmica.

Ao Dr. Wagner Duarte Batista, pela acolhida, apoio irrestrito e suporte de amigo-professor.

À Profa. Paula Vidigal pela paciência, maneira delicada de transmitir conhecimento, disponibilidade e apoio no Laboratório de Patologia da UFMG.

À Profa. Hévila Rolim, pela amizade sincera, estímulo constante, por ter me mostrado os caminhos da vida acadêmica e pelos ensinamentos teórico-práticos de nossa amada Oftalmologia.

A Marcelo, responsável técnico do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo suporte incondicional, pela tranquilidade em me ajudar nos procedimentos experimentais, pela experiência com os animais e pela disponibilidade ímpar.

À minha querida família, pela torcida, pelas orações e pelo estímulo constante.

Aos amigos que de perto ou de longe torceram por mim nesta caminhada.

À Fernanda Cesari, pela colaboração e apoio no Laboratório de Patologia da UFMG.

Aos colegas e funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, que caminharam comigo nesta jornada.

Aos funcionários e professores do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da UFMG.

Aos funcionários do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, representados pela Srta. Mari Rocha.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”  
Leonardo da Vinci (1452-1519)

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARVO – Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia, é a maior e mais respeitada organização de pesquisa em visão do mundo

AT – Acetato de Triancinolona

CA – Califórnia

CEUA – Comissão de Ética em Animais

d.p. – Desvio-padrão

DPO – Dia Pós-operatório

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos, órgão de gerenciamento do governo dos Estados Unidos.

5-FU – 5-Fluouracil

GFS – Cirurgia Fistulante de Glaucoma (glaucoma filtration surgery)

HE – Hematoxilina & Eosina

IOP – Pressão intraocular (intraocular pressure)

LSD – Diferença mínima significativa

M – Média e desvio padrão

Md – Mediana

MMC – Mitomicina C

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – Significância estatística

PBS – Tampão fosfato-salino

PD – Dia pós-operatório (postoperative day)

PIGF – Fator de crescimento placentário

Po – Pressão intraocular

TA – Acetato de Triancinolona (triamcinolone acetonide)

TBST – Solução tampão salina

TGF – Fator de transformação do crescimento

TKR – Tirosina quinase

TREC – Trabeculectomia

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR1(Flt1) – Receptor 1 de VEGF

VEGFR2(KDR) – Receptor 2 de VEGF

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$\beta$  Beta

$^{\circ}\text{C}$  Graus Celsius

g Grama

kDa Quilodalton

kg Quilograma

$\mu\text{m}$  Micrômetro

M Molar

mg Miligrama

min Minuto

mL Mililitro

mm Milímetro

mmHg Milímetro de mercúrio

pH Potencial Hidrogeniônico

U Unidade

# ÍNDICES DE ILUSTRAÇÕES

---

## TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos animais segundo o peso no pré-operatório.....	28
Tabela 2 – Caracterização da pressão intraocular ao longo do estudo.....	29
Tabela 3 – Caracterização da resposta inflamatória segundo coloração HE ao longo do estudo.....	38
Tabela 4 – Caracterização da resposta vascular pela marcação do VEGF ao longo do estudo.....	40

## FIGURAS

Figura 1 – <i>Oryctolagus cuniculus</i> , raça Nova Zelândia, antes de ser submetido a exame oftalmológico.....	19
Figura 2 – Tempos cirúrgicos da trabeculectomia no presente modelo experimental.....	22
Figura 3 – Padrão do Sistema de Graduação de Moorfields usado para comparação nos animais de experimentação.....	24
Figura 4 – Corte histológico do globo ocular de coelhos submetidos a cirurgia experimental na região da conjuntiva mostrando revestimento epitelial íntegro.....	26
Figura 5 – Distribuição dos resultados obtidos na avaliação da Po (mmHg) ao longo do estudo.....	28
Figura 6 – Aspecto pós-operatório da trabeculectomia no 7DPO.....	30
Figura 7 – Características dos animais segundo a área da bolha central ao longo do estudo.....	31
Figura 8 – Características dos animais segundo a área máxima da bolha ao longo do estudo.....	32
Figura 9 – Características dos animais segundo a altura máxima da bolha ao longo do estudo.....	33
Figura 10 – Características dos animais segundo a vascularização da área central da bolha ao longo do estudo.....	34
Figura 11 – Características dos animais segundo a vascularização da área máxima da bolha ao longo do estudo.....	35
Figura 12 – Características dos animais segundo a vascularização da área que não pertence à bolha ao longo do estudo.....	36
Figura 13 – Contagem de polimorfonucleares (HE) ao longo do estudo.....	37
Figura 14 – Cortes histológicos (HE) do globo ocular na região conjuntival de coelhos submetidos a cirurgia experimental analisando a contagem de polimorfonucleares.....	38
Figura 15 – Achados referentes a proliferação vascular ao longo do estudo.....	39
Figura 16 – Cortes histológicos (avaliação imunohistoquímica) da conjuntiva de coelhos submetidos a cirurgia experimental, analisando a deposição do cromógeno marrom no endotélio vascular no 14DPO.....	40

## RESUMO

---

**OBJETIVOS:** Investigar a ação do uso de Bevacizumabe, Mitomicina C (MMC) e Acetato de Triancinolona (AT) (isolados e em associação) na cicatrização pós-operatória após trabeculectomia (TREC) em coelhos. **MÉTODOS:** Quarenta e cinco coelhos albinos da raça Nova Zelândia foram submetidos à TREC em ambos os olhos e receberam, no transoperatório, tratamentos diferentes: solução salina; MMC; AT; AT+MMC; Bevacizumabe; Bevacizumabe+MMC. A MMC e a solução salina foram utilizadas abaixo do retalho conjuntival; AT e Bevacizumabe foram utilizados imediatamente após a cirurgia em injeção subconjuntival. Os coelhos foram avaliados em dias diferentes durante o pós-operatório; mediu-se a pressão intraocular (Po) e fez-se a análise da bolha baseada no sistema de classificação de bolha de Moorfields. Os animais foram mortos nos dias 3, 14 e 30 de pós-operatório (DPO). Histologia e imunohistoquímica foram realizadas para avaliar a cicatrização. **RESULTADOS:** O grupo Bevacizumabe+MMC apresentou menor Po ao final do estudo ( $7,7 \pm 0,8$  mmHg), seguido pelos grupos MMC ( $8,8 \pm 1,85$  mmHg) e AT+MMC ( $8,9 \pm 0,9$  mmHg) ( $p=0,001$ ). O grupo Bevacizumabe+MMC apresentou melhores resultados clínicos em relação à altura máxima da bolha, à área central da bolha e à área máxima da bolha ( $p<0,05$ ); o grupo AT+MMC apresentou bolhas mais altas que o grupo MMC ( $p<0,05$ ). A análise de vascularização da área central e da área máxima da bolha mostrou resultados menores nos grupos que utilizaram MMC em 14DPO e 30DPO. Na avaliação do infiltrado inflamatório, o grupo Bevacizumabe+MMC apresentou menores índices em todo o estudo, seguido pelos grupos AT+MMC e MMC ( $p=0,001$ ). A proliferação vascular inicialmente foi menor no grupo AT+MMC; na fase intermediária, foi menor no grupo Bevacizumabe+MMC; e ao final do estudo, o grupo com menores índices nesse critério foi o MMC ( $p=0,001$ ). **CONCLUSÕES:** A associação Bevacizumabe à MMC é efetiva e segura como modulador da cicatrização da TREC neste modelo animal; como também a associação Acetato de Triancinolona a MMC, mas com efeito menor. Os moduladores alternativos isolados não foram tão eficazes como a MMC em monoterapia.

**PALAVRAS-CHAVE:** glaucoma, cicatrização, antimitóticos, trabeculectomia experimental.

## ABSTRACT

---

**PURPOSE:** To investigate the individual and synergistic mechanism of action of bevacizumab, mitomycin C (MMC), and triamcinolone acetonide (TA) during postoperative healing after glaucoma filtration surgery (GFS) in rabbits. **METHODS:** Both eyes of 45 rabbits of New Zealand breed were subjected to GFS. The rabbits received different treatments during the surgery, including saline solution, MMC, TA, TA + MMC, bevacizumab, and bevacizumab + MMC. MMC and saline solution were used below the conjunctival flap. TA and bevacizumab were used immediately after surgery as subconjunctival injections. The rabbits were evaluated on different days postoperatively. Intraocular pressure (IOP) was measured, and analysis of the bleb was done based on the Moorfields Grading System. The animals were sacrificed on postoperative days (PD) 3, 14, and 30. Histological and immunohistochemical examinations were conducted to assess healing. **RESULTS:** The bevacizumab + MMC group displayed the lowest IOP at the end of the study ( $7.7 \pm 0.8$  mm Hg), followed by MMC ( $8.8 \pm 1.85$  mm Hg) and AT + MMC ( $8.9 \pm 0.9$  mm Hg) ( $P = 0.001$ ). The bevacizumab + MMC group displayed the best clinical results in relation to maximum height, central area, and maximum area of the bleb ( $P < 0.05$ ). The TA + MMC group displayed higher blebs than the MMC group ( $P < 0.05$ ). Analysis of vascularization of the central and maximum areas of the bleb revealed smaller values in the groups that used MMC on PD 14 and PD 30. During assessment of inflammatory infiltrates, the bevacizumab + MMC group had lower indexes in the whole study, followed by the TA + MMC and MMC groups ( $P = 0.001$ ). Initially, vascular proliferation was lower in the TA + MMC group. In the intermediary stage, it was lower in the bevacizumab + MMC group. At the end of this study, the MMC group had the lowest indexes ( $P = 0.001$ ). **CONCLUSIONS:** The combination of bevacizumab and MMC was effective and safe as a GFS healing modulator in this animal model. The combination of triamcinolone and MMC was also effective, but not so effective as bevacizumab + MMC. The isolated alternative modulators were not as effective as MMC monotherapy.

**KEY WORDS:** glaucoma, healing, antimetabolites, experimental trabeculectomy.

# SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>ANIMAIS</b>	<b>19</b>
3.1.1	Anestesia dos animais	20
<b>3.2</b>	<b>FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>20</b>
3.3.1	Cuidados pós-operatórios	22
<b>3.4</b>	<b>MORTE DOS ANIMAIS</b>	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISE CLÍNICA</b>	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISE HISTOLÓGICA</b>	<b>25</b>
<b>3.7</b>	<b>ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>25</b>
<b>3.8</b>	<b>ANÁLISE DAS IMAGENS</b>	<b>26</b>
<b>3.9</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DA PRESSÃO INTRAOCULAR</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>AVALIAÇÃO CLÍNICA</b>	<b>30</b>
4.3.1	Avaliação da área central da bolha	31
4.3.2	Avaliação da área máxima da bolha	32
4.3.3	Avaliação da altura máxima da bolha	33
4.3.4	Avaliação da vascularização da área central da bolha	34
4.3.5	Avaliação da vascularização da área máxima da bolha	35
4.3.6	Avaliação da vascularização da área que não pertence à bolha	36
4.3.7	Avaliação das complicações	36
<b>4.4</b>	<b>AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>53</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>

# 1 INTRODUÇÃO

---

O glaucoma é uma neuropatia óptica progressiva multifatorial, representa um complexo de doenças oculares caracterizadas pelo desequilíbrio da pressão intraocular (Po) incompatível com o funcionamento normal do nervo óptico e caso não seja tratado adequadamente, resulta em cegueira irreversível.<sup>1</sup>

É um problema de saúde pública, sendo a segunda maior causa de cegueira na população.<sup>2</sup> Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o glaucoma é responsável por 13% da cegueira global e, a cada ano, surgem mais 2,4 milhões de casos novos. O número estimado tanto com glaucoma de ângulo aberto quanto de ângulo fechado foi de 60,5 milhões em 2010. Em 2020, estima-se que esse número aumentará em mais 20 milhões de pessoas, dentre essas, 11,1 milhões cegas bilateralmente.<sup>3</sup> Na América Latina, há aproximadamente 5,7 milhões de pessoas com a doença, e esse número irá aumentar para oito milhões em 2020.<sup>4</sup>

A patogênese do glaucoma está diretamente relacionada à dinâmica do humor aquoso. O equilíbrio entre a produção, a circulação e a drenagem desse fluido é essencial para manter a pressão intraocular estável. Quando um ou mais desses parâmetros é alterado, a pressão intraocular entra em desequilíbrio, iniciando danos irreversíveis a camada de fibras nervosas.<sup>5, 6</sup> Por isso, os mecanismos de regulação do fluxo do humor aquoso são relevantes em relação ao tratamento do glaucoma.<sup>7, 8</sup>

O tratamento disponível é dirigido para a diminuição da Po pela redução da produção do humor aquoso pelo corpo ciliar, do aumento da drenagem desse fluido através da malha trabecular ou uveoescleral, como também pela criação cirúrgica de uma rota alternativa para sua saída.<sup>1</sup> O objetivo da terapêutica disponível é preservar a função visual ao reduzir a pressão intraocular a valores inferiores aos que produziriam dano ao nervo óptico.

Medicações tópicas são geralmente o primeiro passo no tratamento do glaucoma. Esses agentes hipotensores oculares podem ser divididos em diversos grupos, baseados em sua estrutura química e ação farmacológica.<sup>9</sup> O tratamento cirúrgico do glaucoma é geralmente realizado quando a terapia medicamentosa não é adequada,

tolerada, efetiva ou não está sendo adotada corretamente pelo paciente e o glaucoma permanece com controle insatisfatório.

Desde a primeira descrição, em 1968, por Cairns e Watson<sup>10, 11</sup>, no Reino Unido, a trabeculectomia tornou-se o procedimento mais utilizado no tratamento cirúrgico do glaucoma. Essa cirurgia difere das anteriores por seu caráter fistulante com uso de um retalho escleral de espessura parcial para regular a drenagem de humor aquoso, minimizando as complicações de hiperfiltração e endoftalmite.<sup>12</sup> A técnica cirúrgica tem o objetivo de formar uma fístula que crie uma via alternativa para a drenagem no humor aquoso da câmara anterior para o espaço subconjuntival, a fim de reduzir a pressão intraocular.

Landers *et al.* (2012), mostraram os resultados de estudo de 20 anos de acompanhamento de pacientes com diversos tipos de glaucoma submetidos a trabeculectomia; 57% dos participantes foram classificados como sucesso total.<sup>13</sup> Aqueles com risco de falência cirúrgica eram mais jovens, tinham glaucoma secundário à uveíte, utilizavam dois ou mais medicamentos tópicos ou apresentavam perda de campo visual avançada. Indicaram que o sucesso da trabeculectomia foi de aproximadamente 60% sem nenhuma medicação e aproximadamente 90% com medicação tópica associada. Eles concluíram que essa técnica cirúrgica é solução a longo prazo para o controle pressórico.<sup>13</sup> Contudo, o principal limitante do resultado satisfatório na cirurgia do glaucoma é a excessiva resposta cicatricial da conjuntiva, comprometendo o sucesso cirúrgico.<sup>14</sup>

Ao contrário de muitos outros tipos de cirurgia, em que a cicatrização completa do tecido seria o resultado desejável, a cirurgia de glaucoma visa alcançar resposta à cicatrização incompleta para permitir a drenagem do humor aquoso através da fístula. A trabeculectomia completamente cicatrizada é cirurgia falida.<sup>14</sup> Por isso, o processo de cicatrização é fator determinante da Po final após as cirurgias, e a modulação dessa resposta é muitas vezes necessária com o fim de maximizar o bom resultado cirúrgico.

O processo de cicatrização de feridas é evento fisiológico complexo e dinâmico que compreende uma cascata de diferentes processos intimamente ligados, incluindo

a fase inflamatória, seguida pela fase proliferativa e de reparação e, finalmente, a fase de remodelamento.<sup>15</sup>

A chegada de neutrófilos, monócitos, linfócitos e macrófagos para a área da ferida, como também o processo de hemostasia e ativação da cascata de coagulação caracterizam a fase inflamatória. Nessa fase, ocorre também liberação de citocinas, fatores de crescimento e proteases. Na fase proliferativa, acontecem a reepitelização, aumento da atividade e número de fibroblastos, assim como a angiogênese e a deposição do tecido de granulação. Na fase de remodelamento, o fibroblasto permanece como elemento chave, sendo responsável não só pela contração da ferida como também pela deposição e síntese de nova matriz e sua estruturação.<sup>14,15</sup>

A angiogênese, processo de crescimento de novos vasos sanguíneos, é elemento chave da fase proliferativa da cicatrização. A maioria dos estudos sugere que a neovascularização é importante para a cicatrização, fornecendo oxigênio e nutrientes para suportar o rápido crescimento das células que medeiam o reparo.<sup>16</sup> Além de auxiliar na remoção de detritos celulares, a angiogênese facilita o início do fechamento da ferida fornecendo a matriz vascular para a formação de tecido de granulação.<sup>17</sup> É controlada em grande medida por níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).<sup>16, 18, 19</sup>

A família de VEGF em seres humanos é composta por várias proteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PlGF). Elas atuam através da ligação a receptores de alta afinidade de tirosina quinase (TKRs). O VEGF-A, uma glicoproteína homodimérica de 40 a 45 kDa, é o principal responsável pela angiogênese fisiológica e patológica, e age via receptores VEGFR-1 (Flt1) e VEGFR-2 (KDR). Os efeitos de suas interações são: estimulação das células endoteliais, migração de macrófagos e aumento da permeabilidade vascular.<sup>20</sup> A estimulação de VEGFR-1 (Flt1) aumenta a atração e migração de células inflamatórias (macrófagos). O VEGFR-2 é expresso principalmente em células endoteliais vasculares. Sua estimulação é sinal importante não só para a proliferação, migração e angiogênese das células endoteliais, mas também para a proliferação de fibroblastos. O VEGF-A possui várias isoformas: VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189 e VEGF-A206, que são classificadas pelo número de aminoácidos. Entre eles, o VEGF-A165 é o mais potente e o mais abundante.<sup>18,21</sup>

Há diversos agentes disponíveis que podem modificar a resposta à cicatrização. Estratégias vêm sendo utilizadas para a modulação dessa resposta, incluindo fatores que afetam especificamente fibroblastos, síntese e degradação da matriz extracelular, inflamação, fibrinólise, angiogênese, fatores de crescimento. Na prática oftalmológica, os antimetabólitos, 5-fluouracil (5-FU) e Mitomicina C (MMC), revolucionaram a história da cirurgia do glaucoma, por isso, são os fármacos mais utilizados na modulação da cicatrização.<sup>14, 22</sup>

A Mitomicina C é agente quimioterápico que possui propriedades antiproliferativas, obtida do filtrado da fermentação do fungo *Streptomyces caespitosus*. Foi descrita por Chen em 1981 com o adjuvante para trabeculectomias com prognóstico ruim; ficando inicialmente, seu uso limitado a casos seletos.<sup>23</sup> Na cirurgia fistulante, esse agente modula a cicatrização da ferida ao atenuar a fase proliferativa de fibroblastos e o crescimento de células endoteliais e de replicação. O efeito de MMC em fibroblastos demonstrou ser muito mais potente e duradouro que o do 5-FU. Estudo experimental com cultura celular descobriu que, enquanto o efeito do 5-FU foi específico para a inibição de fibroblastos, MMC era tóxico para ambos os fibroblastos e as células endoteliais.<sup>24</sup> Khaw *et al.* (1993) também demonstraram que a MMC tem ação superior ao 5-FU. Relataram que culturas de fibroblastos de olhos de coelhos tratados apenas com MMC permaneceram por um mês com ação antiproliferativa; contudo, o grupo tratado com 5-FU apresentou essa ação por apenas sete dias.<sup>25</sup> Dada a sua ação prolongada e potente, MMC precisa de apenas única aplicação intraoperatória, vantagem significativa sobre as múltiplas injeções de 5-FU.

Por volta de 1980, os agentes antimetabólicos, tais como 5-FU e MMC foram considerados eficazes na inibição de fibroblastos. Embora eles tenham impactado a taxa de sucesso da cirurgia do glaucoma, apresentam maior risco de complicações. Com níveis mais baixos de exposição, as complicações são menos frequentes, mas o fracasso cirúrgico é mais comum, representando limite tênue entre eficácia e segurança.<sup>26</sup> O mecanismo não específico desses agentes pode resultar em várias complicações oculares como toxicidade corneal, bolhas avasculares, endoftalmite, hipotonia e, em alguns pacientes, são ineficazes.<sup>26</sup> Por conseguinte, ainda há necessidade de estratégias alternativas para impedir a falência cirúrgica secundária ao excesso de cicatrização.

Bevacizumabe (Avastin®; Genentech, South San Francisco, CA, USA) é um anticorpo monoclonal humanizado de comprimento longo contra todas as isoformas de VEGF-A. Seu peso molecular é 148 kDa, por isso, é uma grande molécula com o dobro de meia-vida (mais de 20 dias) do Ranibizumabe, apresentando potencial para reações inflamatórias e imunológicas.<sup>21, 27</sup> Foi originalmente aprovado pelo *FDA (Food and Drug Administration)* para terapia de primeira linha de câncer colorretal metastático, mas já é utilizado no tratamento de vários outros tumores sólidos (mama, ovário e renais) e glioblastoma. Contudo, na oftalmologia, ainda não é padronizado como tratamento pelos órgãos competentes (*FDA* e *ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária*).<sup>21, 28</sup> Estudos clínicos vêm encorajando o uso do Bevacizumabe intravítreo para diferentes desordens retinianas.<sup>29-31</sup> Pesquisas já mostram que o bloqueio do VEGF é alvo promissor para o desenvolvimento de moduladores alternativos na cicatrização das cirurgias fistulantes.<sup>32-34</sup>

Agentes anti-inflamatórios já fazem parte da estratégia para modular a inflamação e cicatrização de feridas no olho. Os hormônios esteroides podem ser vistos como protótipo.<sup>14</sup> Acetato de triancinolona é um corticosteroide em forma de suspensão injetável que tem sido utilizado na prática oftalmológica, por mais de 50 anos, no tratamento de doenças neovasculares, proliferativas e edematosas.<sup>35</sup> Apresenta ação anti-inflamatória e antifibrótica baseada na indução da síntese de lipocortina e seu efeito vasoconstrictor.<sup>36</sup> A inibição da inflamação e da cicatrização da ferida por corticosteroides é largamente mediada pela supressão da concentração de leucócitos e de sua funcionalidade, assim como pelos seus efeitos sobre a permeabilidade vascular. Isso leva a menor inflamação local, redução da liberação de fatores de crescimento e da produção de coagulo e fibrina; como resultado, ocorre diminuição da atividade de fibroblastos e da resposta cicatricial.<sup>15</sup> Seu potencial anti-inflamatório é aproximadamente cinco vezes o do cortisol.<sup>37, 38</sup>

Apesar de já existirem pesquisas avaliando os efeitos de agentes anti-VEGF e Acetato de Triancinolona na trabeculectomia, seus resultados são conflitantes<sup>32, 39, 40,</sup> <sup>41</sup> e ainda não está claro se esses antifibróticos podem substituir o uso de antimetabólitos na prática clínica ou devem ser usados como adjuvantes da MMC ou 5-FU na cirurgia do glaucoma. Por isso, neste estudo, objetivou-se avaliar em modelo experimental de trabeculectomia o uso de Bevacizumabe, Acetato de Triancinolona isolados ou associados à Mitomicina C na modulação da cicatrização.

## **2 OBJETIVOS**

---

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- ✓ Avaliar a bolha fistulante antiglaucomatosa em olhos de coelhos após administração de Bevacizumabe, Acetato de Triancinolona isolados ou associados à Mitomicina C.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Comparar as pressões intraoculares pré-operatória e pós-operatórias em cada grupo estudado.
- ✓ Avaliar as características clínicas da bolha fistulante baseada na classificação da bolha de Moorfields após a administração de Mitomicina C, Acetato de Triancinolona e Bevacizumabe em coelhos.
- ✓ Analisar, após a administração dos agentes moduladores, a resposta à cicatrização no pós-operatório através de análise histológica e imunohistoquímica.

### 3 MÉTODOS

---

Foi realizado estudo experimental no Biotério e Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A pesquisa seguiu os preceitos da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (ARVO) e os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética em Animais (CEUA / UFMG), tendo sido aprovada por este Comitê em 10/07/2012; (Protocolo nº 149/2012 – anexos A e B).

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 45 coelhos machos, albinos, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia (figura 1), fornecidos pela Fazenda Veterinária da UFMG. Esses animais apresentavam idade de dois a três meses, peso entre 2 kg e 3 kg (apêndice A), em bom estado geral, livres de endoparasitas e ectoparasitas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais numeradas. A identificação de cada coelho foi feita na orelha direita com tinta insolúvel em água. Foram alimentados com ração e água, e o ciclo claro e escuro foi respeitado. O período de aclimação foi de uma semana.

*Figura 1 – Oryctolagus cuniculus, raça Nova Zelândia, antes de ser submetido a exame oftalmológico.*



### 3.1.1 Anestesia dos animais

A anestesia para o procedimento cirúrgico foi feita via intramuscular em pata traseira esquerda com Cetamina (Richmond División Veterinaria S.A., Buenos Aires, Argentina) 35 mg/Kg + Xilazina (Calier S.A., Barcelona, Espanha) 5 mg/Kg + Acepromazina (Richmond División Veterinaria S.A., Buenos Aires, Argentina) 0,75 mg/ Kg, e tópica pela instilação de 1 gota de cloridrato de proximetacaína a 0,5% (Novartis, São Paulo, Brasil). Durante os exames oftalmológicos no pós-operatório, utilizou-se anestesia tópica com a instilação de uma gota de cloridrato de proximetacaína a 0,5%.

## 3.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Houve formação de seis grupos experimentais, já que os animais foram submetidos a cirurgia bilateralmente e receberam diferentes tratamentos em olho direito e esquerdo. Foram avaliados 15 olhos em cada grupo ao longo do estudo:

- ✓ Grupo controle (solução salina);
- ✓ Grupo MMC;
- ✓ Grupo AT;
- ✓ Grupo AT+MMC;
- ✓ Grupo Bevacizumabe;
- ✓ Grupo Bevacizumabe+MMC,

## 3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os animais tiveram os dois olhos submetidos à cirurgia de trabeculectomia, sob condições estéreis, pelo mesmo cirurgião, utilizando a mesma técnica.

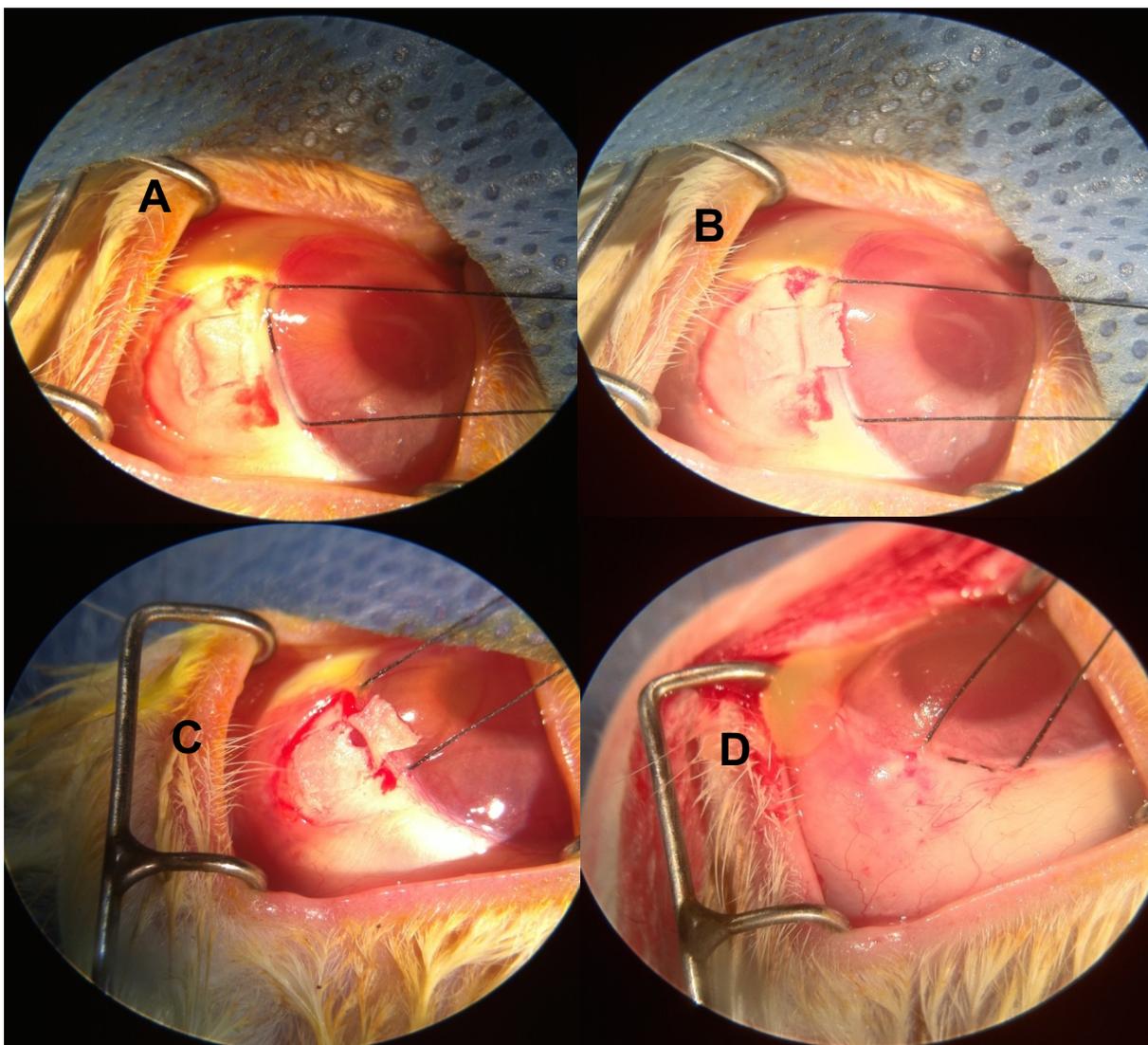
Os animais foram posicionados e contidos em decúbito lateral. Foi realizada assepsia/antisepsia com polivinil-pirrolidona a 0,2% tópica, em seguida aposição de campos cirúrgicos estéreis. A exposição do olho foi feita com blefarostato. Utilizou-se uma sutura de tração corneana com fio seda 6-0 (Ethicon, São Paulo, Brasil). A confecção de retalho conjuntival foi base fórnice no quadrante superior com tesoura conjuntival com exposição da esclera e a hemostasia foi feita meticulosamente. Em seguida, o retalho escleral (3mm x 3mm) foi confeccionado com lâmina 11 e bisturi cres-

cente escleral. Uma paracentese corneana foi feita usando um bisturi 15 graus. A esclerotomia foi feita com esclerótomo (Argos, Minas Gerais, Brasil) e a iridectomia periférica, com tesoura de Vannas (Argos, Minas Gerais, Brasil). O retalho escleral foi fechado com duas suturas nos vértices com fio mononylon 10-0 (Ethicon, São Paulo, Brasil). O fechamento conjuntival foi feito por meio de suturas com fio mononylon 10-0. Ao final da cirurgia, foi instilada uma gota de colírio de moxifloxacino a 0,5% e dexametasona a 0,1% associados (Novartis, São Paulo, Brasil) (figura 2).

O grupo controle e os diferentes adjuvantes foram administrados conforme protocolo:

- 1- A solução salina (0,2mL) foi aplicada com esponjas abaixo da cápsula de Tenon e sob retalho escleral, durante 2 minutos, e lavada copiosamente com 3 mL de solução salina.
- 2- A MMC (Citopharma, Belo Horizonte, Brasil) (0,4mL) a 0,03% foi aplicada com esponjas abaixo da cápsula de Tenon e sob retalho escleral, durante 2 minutos, e lavada copiosamente com 3 mL de solução salina.
- 3- O Acetato de Triancinolona (Novartis, São Paulo, Brasil) (4mg) foi administrado via subconjuntival superiormente à ampola fistulante ao final da cirurgia.
- 4- O Bevacizumabe (Genentech Inc, South San Francisco, USA) (1,25mg/0,05mL) foi aplicado via subconjuntival superiormente à ampola fistulante ao final da cirurgia.

Figura 2 – Tempos cirúrgicos da trabeculectomia no presente modelo experimental.



**A:** confecção do retalho conjuntival base fórnice; **B:** confecção do retalho escleral; **C:** esclerotomia; **D:** fechamento conjuntival com fio Nylon 10-0.

### 3.3.1 Cuidados pós-operatórios

Nos cuidados pós-operatórios, foi realizada analgesia via subcutânea com ceto profeno 2mg/kg nas primeiras 24 horas. A prescrição pós-operatória foi padronizada com: uma gota de colírio de moxifloxacino a 0,5% associado a cloridrato de dexametasona a 0,1% 4x/dia e colírio de sulfato de atropina a 1% 2x/dia nos primeiros sete dias. Em seguida, foi utilizado apenas cloridrato de dexametasona a 0,1% com diminuição gradativa a cada semana até a suspensão da medicação.

### 3.4 MORTE DOS ANIMAIS

Cinco coelhos de cada grupo foram mortos e enucleados nos dias: 3, 14 e 30 para avaliação de marcadores de cicatrização e proliferação celular, com pentobarbital (Calier S.A, Barcelona, Espanha) (150 mg/kg) intravenoso pela veia marginal da orelha esquerda, para coleta dos globos oculares. Depois de constatada a morte, os olhos operados foram enucleados. A conjuntiva bulbar do globo ocular foi dissecada, garantindo acesso ao espaço periorbitário. A dissecação se estendeu aos músculos oculares e ao espaço retro-orbitário, expondo a esclera até a identificação do nervo óptico, seu isolamento e secção.

### 3.5 ANÁLISE CLÍNICA

No pré-operatório, todos os animais foram examinados para detectar possíveis alterações oculares que pudessem comprometer o resultado da pesquisa, como também foi avaliada a pressão intraocular prévia.

Após o procedimento cirúrgico houve avaliação nos dias 1, 3, 7, 14 e 30 pós-operatórios (DPO). Os parâmetros avaliados foram: tonometria de aplanção, aspecto da bolha fistulante e complicações cirúrgicas.

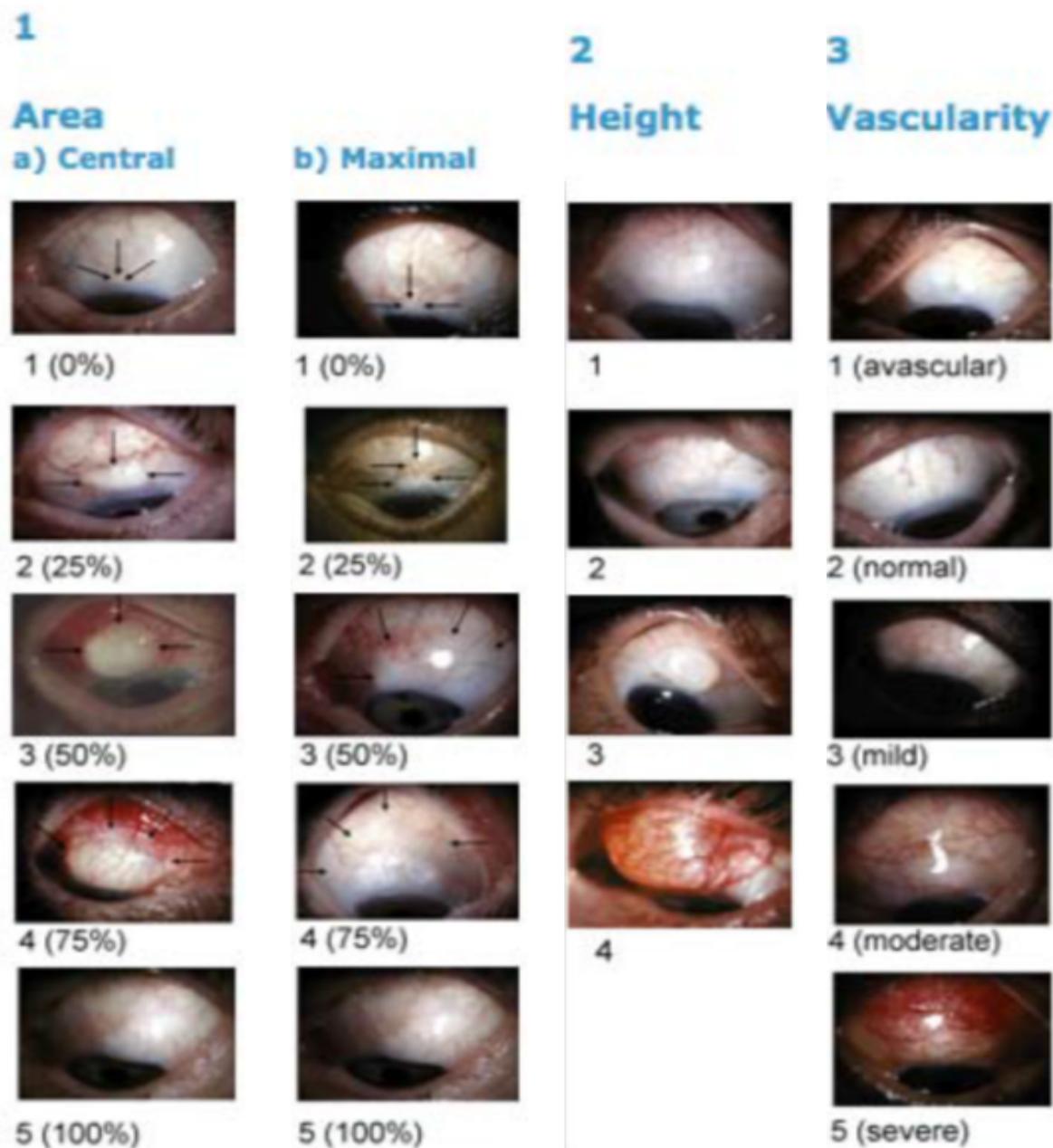
Do pré-operatório ao 3 DPO, foram examinados 15 olhos por grupo. No 7 DPO e 14 DPO, avaliaram-se 10 olhos por grupo. E no 30 DPO, foram analisados 5 olhos por grupo.

O exame oftalmológico foi realizado por biomicroscopia na lâmpada de fenda Apramed HS2. Após anestesia tópica (proximetacaína 1%, laboratórios Alcon, Brasil) e instilação de fluoresceína (Allergan, São Paulo, Brasil), a tonometria de aplanção foi realizada com o Tonômetro de Perkins (Haag-Streit, Koniz, Switzerland), por meio da média das três medidas da Po em ambos os olhos.

O estudo da bolha fistulante foi baseado na avaliação fotográfica do local cirúrgico e comparação com as fotos do sistema de classificação da bolha de Moorfields (figura 3), descrito por Wells et al (2004).<sup>42</sup> Procedeu-se à avaliação dos seguintes parâmetros relacionados à bolha: área central (1a), área máxima (1b), altura (2) e

vascularização (3). Cada um desses parâmetros apresenta modelo de fotografias padrão, segundo o qual se deve atribuir pontuação, por comparação visual direta. Observou-se também presença de complicações cirúrgicas. Essa análise fotográfica foi realizada por outro examinador que não conhecia os grupos.

Figura 3 – Padrão do Sistema de Graduação de Moorfields usado para comparação nos animais de experimentação.



### 3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O material foi colocado em frascos identificados, contendo solução fixadora tamponada (formaldeído 10% em tampão fosfato 0,1M), por 24 horas, imediatamente após a retirada do globo ocular. Após esse tempo, em cada porção superior do globo ocular foram feitos três cortes sagitais da área operada. As amostras passaram, então, por desidratação progressiva, em banhos com concentrações crescentes de álcoois. Foi feita diafanização e preparação de blocos de parafina. A partir dos blocos, foram feitos cortes seriados, utilizando-se micrótomo manual. A espessura dos cortes foi de 6 µm e eles foram montados sobre lâminas de histologia. O material foi corado com Hematoxilina & Eosina (HE) para todos os animais e a região da conjuntiva foi avaliada para contagem de células inflamatórias (polimorfonucleares).

### 3.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Foi utilizado o anticorpo VEGF (C-1): SC-7269 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia – USA) para investigar a expressão do VEGF A.

Os mesmos blocos de parafina foram usados. A espessura dos cortes foi de 4 µm por micrótomo manual. Foram incubados por uma hora em estufa a 60°C. Em seguida, passaram pelo processo de desparafinização em três banhos de xilol, foram hidratados com a séria alcóolica a 100%, 95% e 70%, até água destilada.

A recuperação antigênica foi feita com desnaturação em calor úmido, mediante incubação dos cortes em solução tampão (citrato de sódio, pH 6,0) e aquecimento do meio. Foi feito banho sorológico por 40 minutos, mantendo-se a temperatura entre 96 e 98°C. As lâminas foram lavadas, secadas e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado distribuindo as lâminas em uma bandeja e posteriormente lavagem com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) por três minutos. Os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 3%, conforme as instruções do fabricante e lavados duas vezes com PBS por três minutos e duas vezes com TBST (*Tris-Buffered Saline Tween-20*) por três minutos.

A ligação do anticorpo específico foi realizada pingando-se o anticorpo primário já diluído, na proporção de 1:100. Foi utilizado o anticorpo VEGF (C-1): SC 7269, em

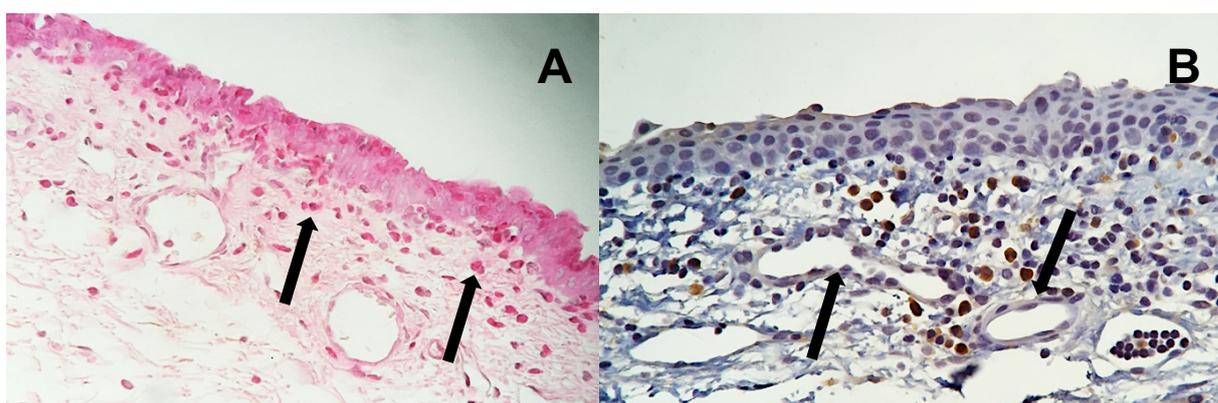
incubação a 4°C durante a noite. Seguiu-se a aplicação do anticorpo secundário, conjugado com biotina ligante, incubando-se em estufa a 30°C por 25 minutos. Foi aplicado o complexo estreptovidina-peroxidase nas mesmas condições do procedimento anterior. Procedeu-se, por meio da imersão dos cortes em hematoxilina, à etapa de revelação com diaminobenzina e contra coloração.

### 3.8 ANÁLISE DAS IMAGENS

As imagens (figura 4) para análise quantitativa dos polimorfonucleares e da proliferação vascular através da marcação do VEGF A foram obtidas pelo sistema que inclui microscópio Leica DMLB<sup>®</sup> acoplado a uma câmera Leica modelo DC300 e programa visualizador de imagem IM50 da mesma marca, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina – UFMG. De cada lâmina, foram retiradas três fotos em sequência da área relacionada com aumento de 400 vezes. Tais fotografias receberam codificação para que a referência aos grupos não fosse possível.

Os arquivos com as fotos foram avaliados por uma patologista experiente, do Setor de Patologia da UFMG, a quem foi solicitada a contagem dos polimorfonucleares em HE e a avaliação da expressão do VEGF-A pela deposição de cromógeno marrom no endotélio vascular do tecido conjuntival.

*Figura 4 – Corte histológico do globo ocular de coelhos submetidos a cirurgia experimental na região da conjuntiva mostrando revestimento epitelial íntegro.*



*Presença de células inflamatórias polimorfonucleares (setas), HE (A); avaliação imunohistoquímica da região descrita em A em que se observa deposição de cromógeno marrom no endotélio vascular (setas)(B).*

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações coletadas foram digitadas no Excel®. O Software Estatístico utilizado foi o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, USA), versão 19.0. Para as variáveis quantitativas, foram obtidas medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio-padrão), além, de percentuais como medidas para descrever os resultados das variáveis estudadas.

Para o cálculo amostral foi utilizado a calculadora G-POWER 3.1. A variável escolhida para este cálculo foi a Po, foi achado número total mínimo de 30 olhos, para o tamanho do efeito de 0,20, com nível de significância de 0,05, nível de confiança de 0,95, poder da amostra de 0,80 e correlação de 0,50.

Foram utilizados testes não-paramétricos nas análises que envolveram a compreensão do comportamento das variáveis: área central ou máxima da bolha, altura máxima da bolha, vascularização da área central ou máxima bolha e vascularização da área que não pertence à bolha. A comparação entre grupos independentes foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Na comparação entre as fases foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman.

Com o objetivo de avaliar a influência dos grupos e das fases do estudo na pressão intraocular foi utilizada a análise de variância baseada em um planejamento de medidas repetidas. Além de avaliar a influência destes fatores (grupo e fase), avaliou-se também se existia alguma interação entre os dois fatores. Quando a análise indicou a existência de alguma diferença significativa utilizou o teste de comparações múltiplas *LSD* (*Least Significant Difference*).

A avaliação da influência do grupo e do tempo de avaliação até a morte dos animais (fase) nas variáveis imunohistológicas, bem como da interação entre esses dois fatores (grupo e fase) foi realizada utilizando-se a técnica da análise de variância com dois fatores. Quando a análise indicou a existência de alguma diferença significativa utilizou-se o teste de comparações múltiplas *LSD* (*Least Significant Difference*).

Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 45 animais. A tabela 1 demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao peso inicial dos animais.

Tabela 1 – Caracterização dos animais segundo o peso no pré-operatório.

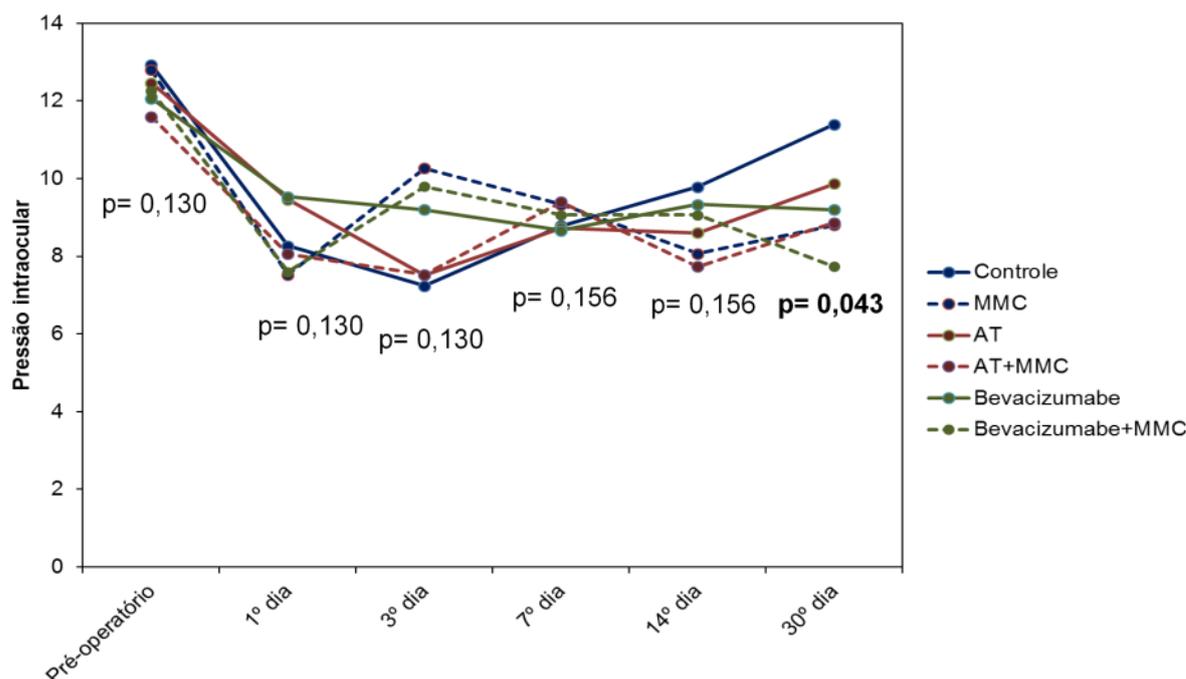
Grupo	Medidas descritivas (g)		p
	$\bar{x} \pm d.p.$	Mediana	
1	2255 $\pm$ 183,3	2250,0	0,910
2	2286,7 $\pm$ 252,5	2200,0	
3	2313,7 $\pm$ 264,5	2225,0	

$\bar{x}$  = média; d.p. = desvio-padrão; G1, G2, G3= grupos dos animais; p= probabilidade.

### 4.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO INTRAOCULAR

Conforme resultados (figura 5) referentes à Po (em mmHg) não houve diferenças significativas entre os grupos até o 14DPO ( $p > 0,05$ ). Já no 30DPO, o grupo Bevacizumabe+MMC ( $7,7 \pm 0,8$  mmHg) apresentou os menores índices pressóricos, seguido pelos grupos MMC ( $8,8 \pm 1,5$  mmHg) e AT+MMC ( $8,9 \pm 0,9$  mmHg) ( $p = 0,043$ ).

Figura 5 – Distribuição dos resultados obtidos na avaliação da Po (mmHg) ao longo do estudo.



Valores de p são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

Em todos os grupos, os valores da pressão-intraocular final foram menores que os do pré-operatório ( $p=0,001$ ) (tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização da pressão intraocular ao longo do estudo.

Grupo	Fase						Comparação Fases (valor de p)
	Pré-operatório	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=12,9±1,5 Md=13,3	M=8,3±1,3 Md=7,7	M=7,2±1,4 Md=6,3	M=8,8±1,1 Md=8,7	M=9,8±1,5 Md=9,7	M=11,4±1,5 Md=11,0	<b>0,001</b>
MMC	M=12,8±0,9 Md=12,7	M=7,5±1,6 Md=6,3	M=10,3±3,2 Md=10	M=9,3±1,4 Md=9,7	M=8,1±0,7 Md=8,0	M=8,8±1,5 Md=8,3	<b>0,001</b>
AT	M=12,5±1,1 Md=12,7	M=9,5±1,5 Md=9,0	M=7,5±1,2 Md=7,7	M=8,7±0,9 Md=9,0	M=8,6±1,7 Md=8,0	M=9,9±1,1 Md=10,0	<b>0,001</b>
AT+MMC	M=11,6±1,6 Md=11,3	M=8,1±2,9 Md=8,0	M=7,5±1,3 Md=7,0	M=9,4±3,0 Md=7,7	M=7,7±0,6 Md=7,7	M=8,9±0,9 Md=9,0	<b>0,001</b>
Bevacizumabe	M=12,1±1,9 Md=12,7	M=9,5±1,9 Md=9,3	M=9,2±1,7 Md=9,3	M=8,7±1,2 Md=8,3	M=9,3±1,5 Md=9,7	M=9,2±1,3 Md=9,0	<b>0,001</b>
Bevacizumabe+MMC	M=12,3±1,3 Md=12,3	M=7,6±1,0 Md=7,0	M=9,8±1,8 Md=9,7	M=9,1±1,6 Md=9,0	M=9,1±1,7 Md=9,7	M=7,7±0,8 Md=7,3	<b>0,001</b>

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

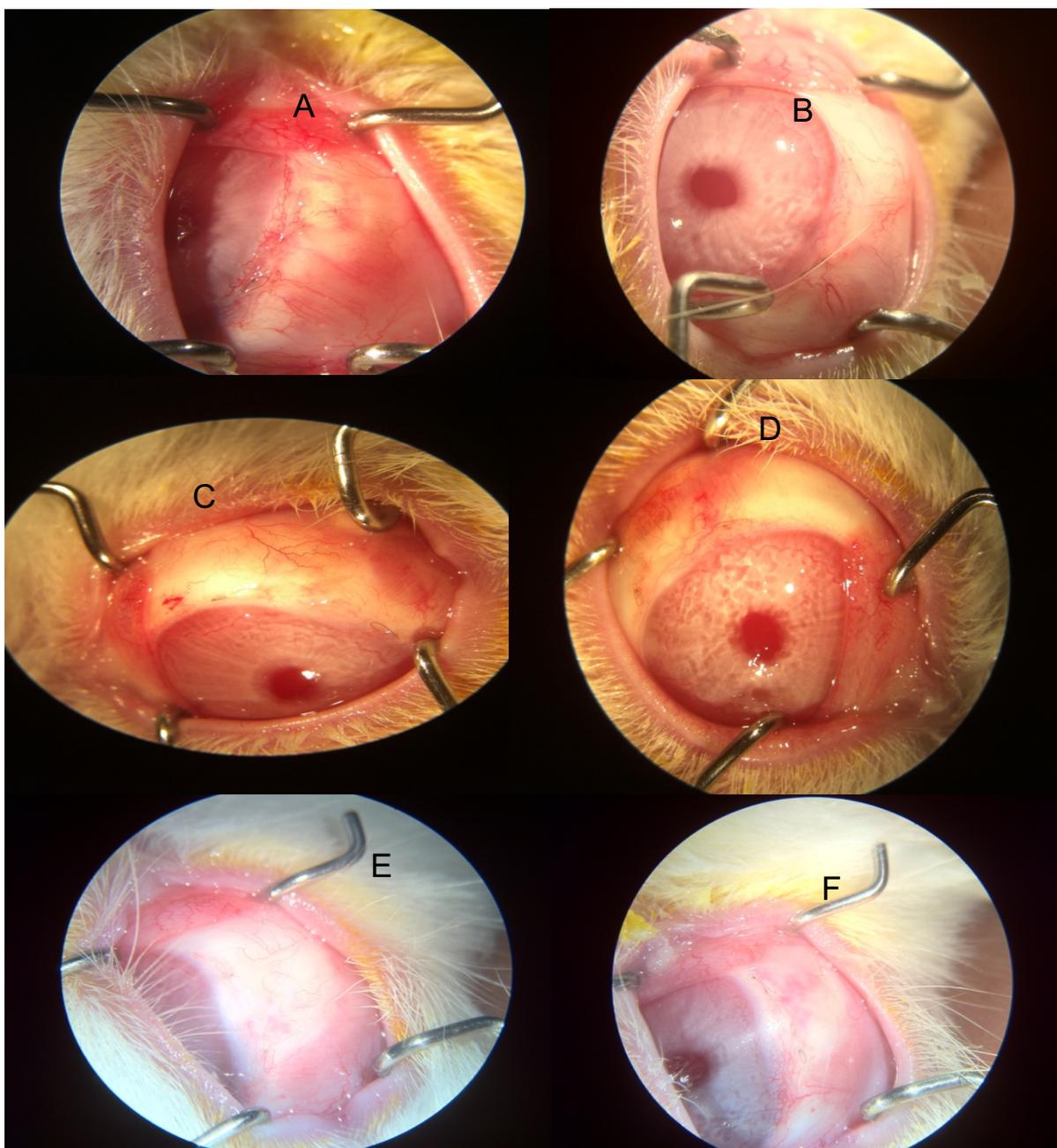
Valores referentes a valores da Po (mmHg).

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

### 4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Pelas fotografias (figura 6) obtidas nos pós-operatórios de cada grupo foi possível a análise da área cirúrgica baseada no protocolo proposto (Sistema de Graduação da Bolha de Moorfields). Os dados avaliados foram comparados entre as fases do estudo e entre os grupos.

*Figura 6 – Aspecto pós-operatório da trabeculectomia no 7DPO.*



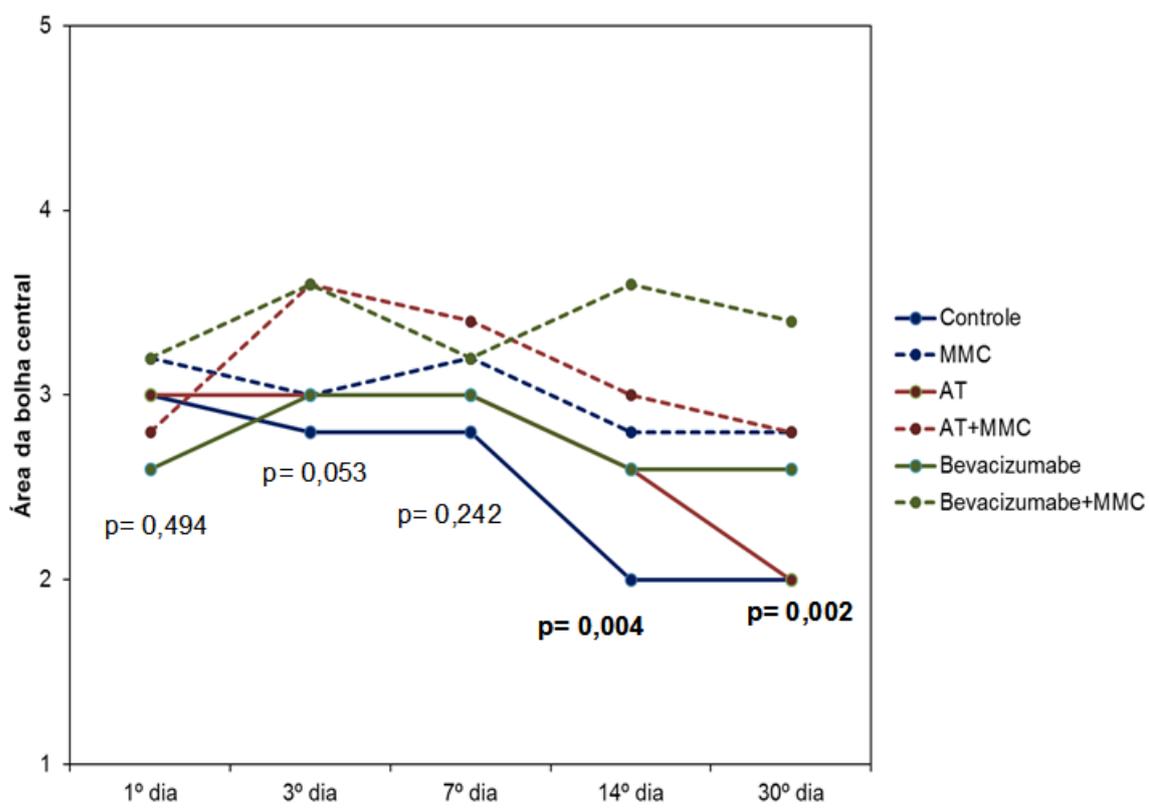
*Grupos: A, controle; B, MMC; C, AT; D, AT+MMC; E, Bevacizumabe; F, Bevacizumabe+MMC.*

### 4.3.1 Avaliação da área central da bolha

Em relação as fases do estudo por grupo, houve diferença significativa no grupo controle ( $p=0,013$ ) e AT ( $p=0,003$ ) que mostraram melhores resultados no 1DPO, 3DPO e 7DPO, e piores resultados no 14DPO e 30DPO. Como também no grupo AT+MMC que apresentou melhores resultados no 3DPO e 7DPO ( $p=0,017$ ). Os grupos MMC, Bevacizumabe e Bevacizumabe+MMC não apresentaram diferença em relação às fases durante o estudo.

Comparando os resultados entre os grupos e a cada uma das fases, houve diferenças no 14DPO em que o grupo Bevacizumabe+MMC apresentou melhores resultados em relação a todos os grupos ( $p=0,004$ ) e no 30DPO, que permaneceu com melhores resultados, e os grupos MMC, AT+MMC foram similares e superiores aos outros grupos ( $p=0,002$ ). (figura 7 e apêndice B)

Figura 7 – Características dos animais segundo a área central da bolha ao longo do estudo.

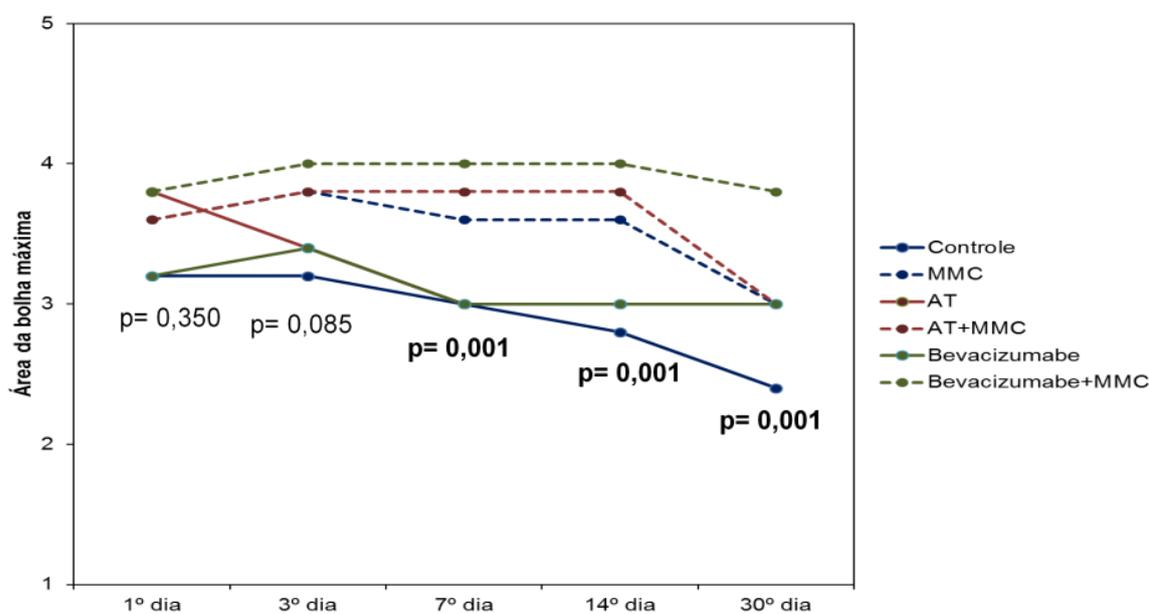


Valores de p são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

### 4.3.2 Avaliação da área máxima da bolha

Houve diferenças em todos grupos quando se compararam as fases do estudo ( $p < 0,05$ ). Avaliando os resultados entre os grupos, houve diferença significativa no 7DPO, 14DPO e 30 DPO ( $p = 0,001$ ), o grupo Bevacizumabe+MMC apresentou os melhores resultados. O grupo AT+MMC superou o grupo MMC no 7 e 14 DPOs, igualando-se no 30 DPO (figura 8 e apêndice C).

Figura 8 – Características dos animais segundo a área máxima da bolha ao longo do estudo.



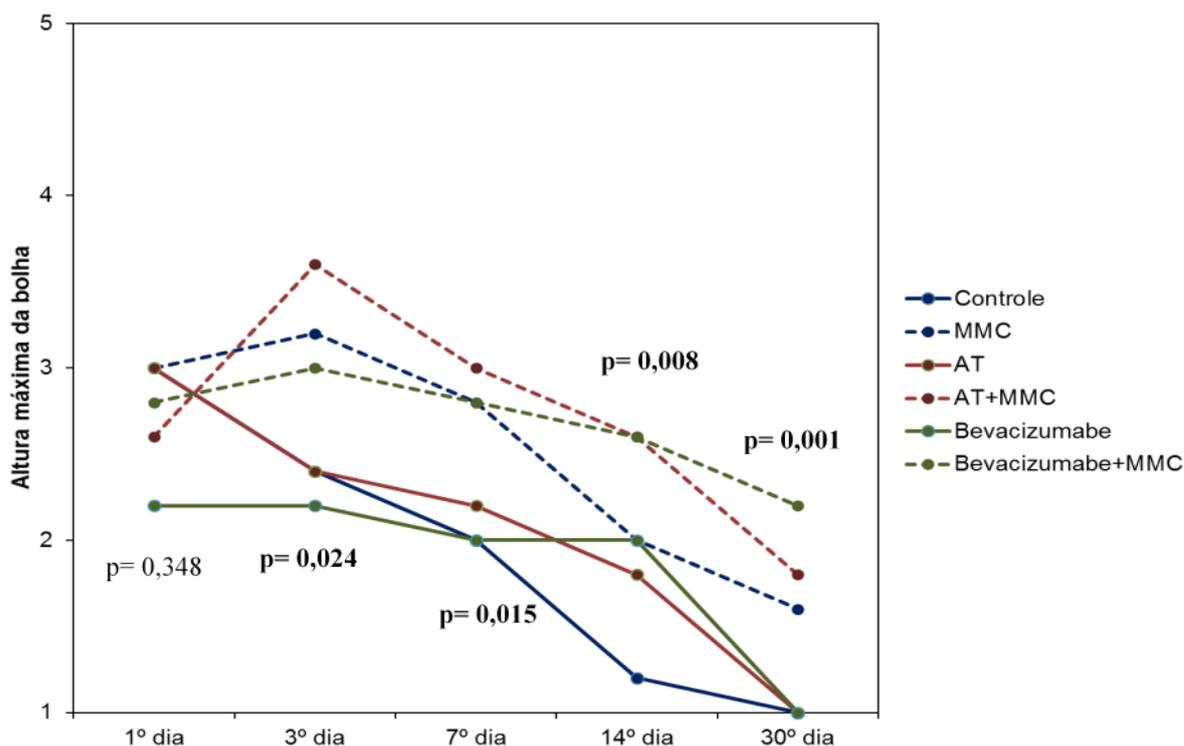
Valores de  $p$  são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

### 4.3.3 Avaliação da altura máxima da bolha

Neste parâmetro, houve diferença na comparação das fases em todos os grupos ( $p < 0,05$ ), exceto no grupo Bevacizumabe+MMC que permaneceu estável em todo o estudo.

Na avaliação dos resultados entre os grupos, já no 3DPO ( $p=0,024$ ) e 7DPO ( $p=0,015$ ) o grupo AT+MMC apresentou bolhas mais altas, seguido pelos grupos MMC e Bevacizumabe+MMC. No 14 DPO ( $p=0,008$ ), os grupos das associações apresentaram melhores resultados. Ao final do acompanhamento, o grupo Bevacizumabe+MMC apresentou o melhor resultado ( $p=0,001$ ), superando o grupo AT+MMC, que apresentou bolhas mais altas que o grupo MMC. (figura 9 e apêndice D)

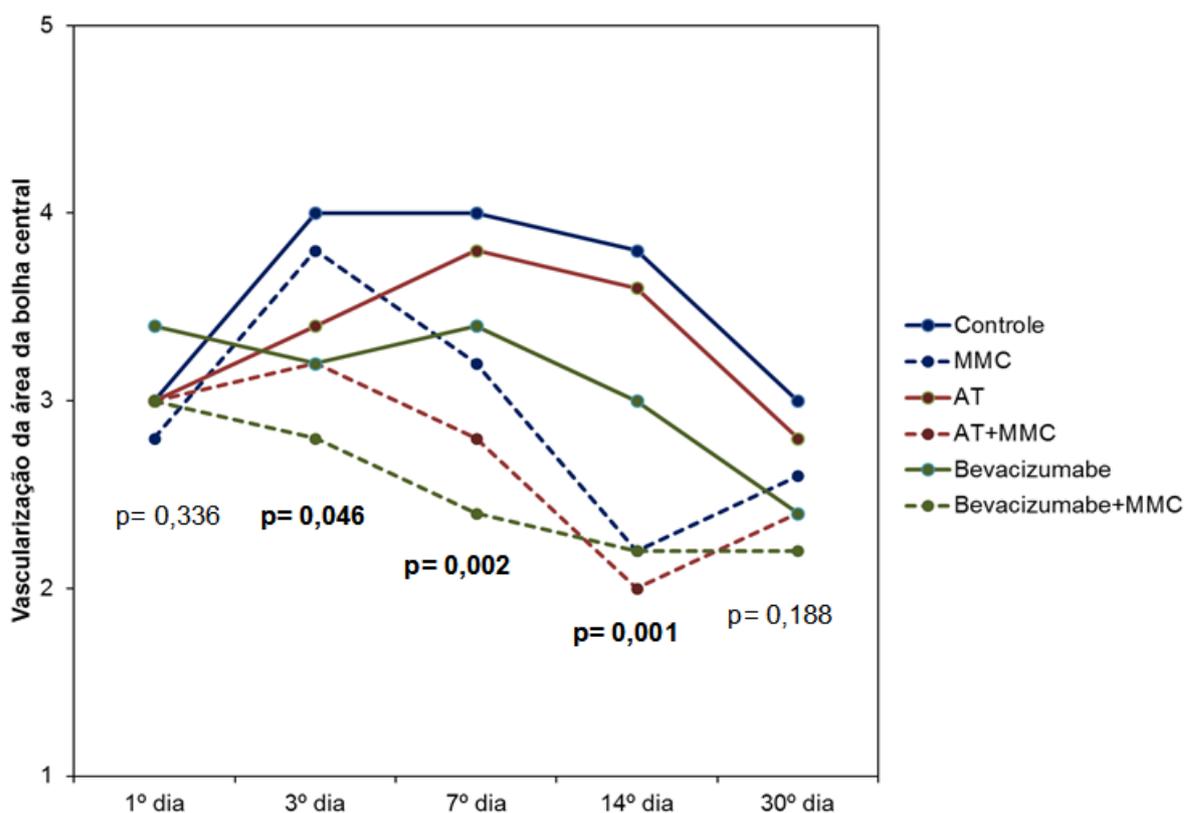
Figura 9 – Características dos animais segundo a altura máxima da bolha ao longo do estudo.



#### 4.3.4 Avaliação da vascularização da área central da bolha

Comparando as fases do estudo em cada um dos grupos, houve diferenças nos grupos controle, MMC, AT e AT+MMC ( $p < 0,05$ ). Analisando os resultados entre os grupos, no 3DPO o grupo controle apresentou maior vascularização e o grupo Bevacizumabe+MMC, menor ( $p = 0,046$ ); no 7DPO este grupo permaneceu com o menor índice ( $p = 0,002$ ); no 14DPO o grupo AT+MMC apresentou melhores resultados nesse critério, seguido pelos grupos MMC e Bevacizumabe+MMC ( $p = 0,001$ ). No início e ao final do estudo, não houve diferença significativa entre os grupos. (figura 10 e apêndice E)

Figura 10 – Características dos animais segundo a vascularização da área central da bolha ao longo do estudo.

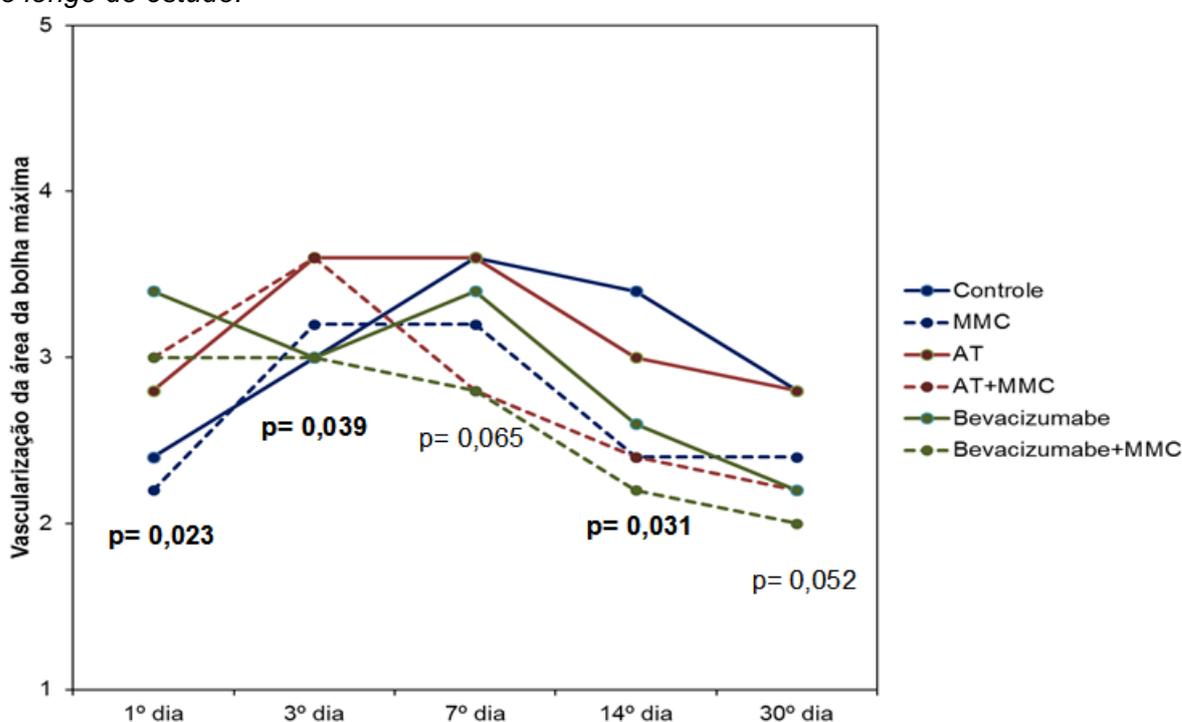


Valores de p são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

#### 4.3.5 Avaliação da vascularização da área máxima da bolha

Os resultados encontrados na avaliação das fases por grupo apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) em todos eles. No 1 DPO, verificou-se pior resultado no grupo Bevacizumabe ( $p = 0,023$ ); no 3DPO, os grupos AT e AT+MMC mostraram maior índice de vascularização; e no 14DPO, os grupos MMC, AT+MMC e Bevacizumabe+MMC apresentaram menores índices ( $p = 0,031$ ). No 7DPO e 30DPO, não houve diferença entre os grupos (figura 11 e apêndice F).

Figura 11 – Características dos animais segundo a vascularização da área máxima da bolha ao longo do estudo.

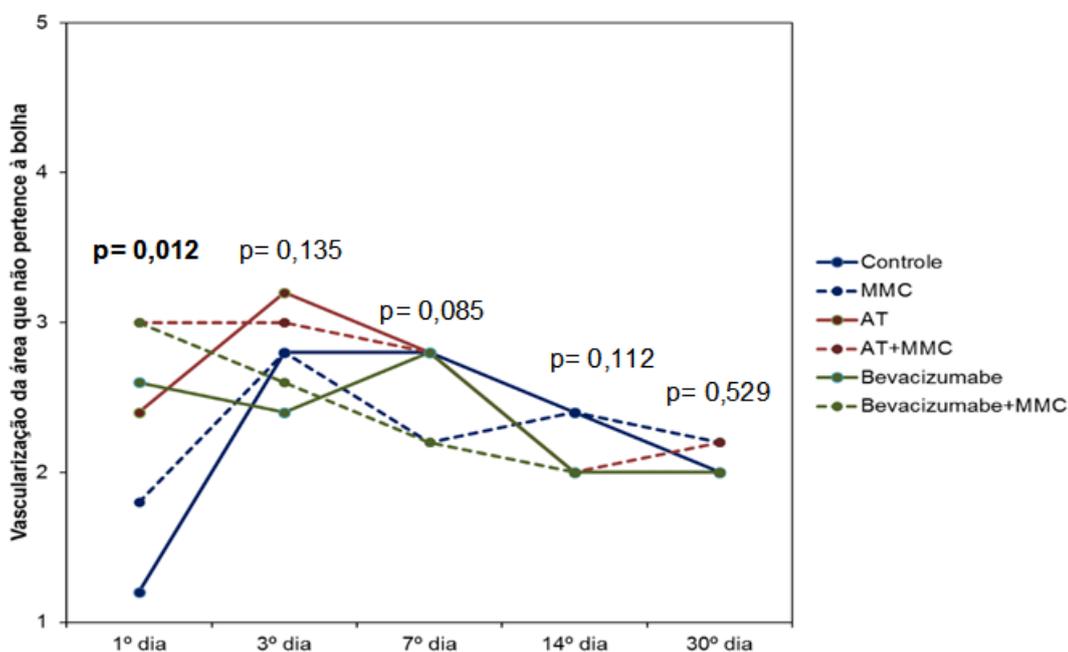


Valores de  $p$  são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

#### 4.3.6 Avaliação da vascularização da área que não pertence à bolha

Na verificação dos resultados desse critério, houve diferença entre as fases do estudo em cada grupo ( $p < 0,05$ ), com exceção do grupo MMC. Já na comparação entre os grupos, apenas no 1DPO houve diferenças significativas ( $p = 0,012$ ), em que os grupos AT+MMC e Bevacizumabe+MMC apresentaram maior vascularização na área fora do sítio cirúrgico (figura 12 e apêndice G).

Figura 12 – Características dos animais segundo a vascularização da área que não pertence à bolha ao longo do estudo.



Valores de  $p$  são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

#### 4.3.7 Avaliação das complicações

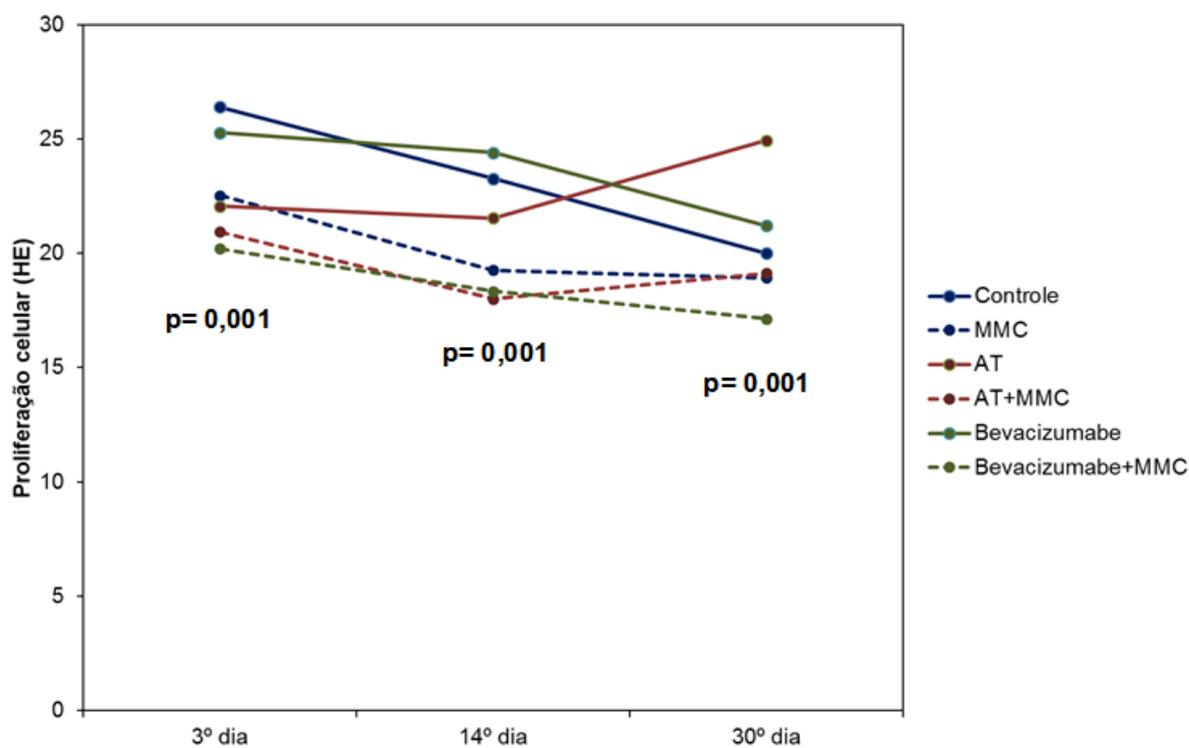
Houve poucas complicações durante o estudo. Hemorragia subconjuntival, pequeno hifema, depósito esbranquiçado subconjuntival (no grupo AT- 1 caso e AT+MMC- 1 caso) e um caso de bolha avascular foram relatados durante as avaliações, mas sem significância estatística para os resultados.

#### 4.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Na análise dos achados histológicos, os resultados encontrados na avaliação das fases em cada grupo apresentaram significância ( $p < 0,001$ ) em todos eles.

Na comparação dos achados entre os grupos, no 3DPO os grupos controle ( $26,4 \pm 2,0$  células/campo) e Bevacizumabe ( $25,3 \pm 2,2$  células/campo) apresentaram maior proliferação de células inflamatórias, já os grupos AT+MMC ( $20,9 \pm 3,7$  células/campo) e Bevacizumabe+MMC ( $20,2 \pm 1,3$  células/campo) apresentaram menores índices ( $p = 0,001$ ). No 14DPO, houve menor reação à inflamação nos grupos AT+MMC ( $18,0 \pm 1,9$  células/campo) e Bevacizumabe+MMC ( $18,3 \pm 1,2$  células/campo) de forma similar ( $p = 0,001$ ). Ao final do estudo, o grupo Bevacizumabe+MMC ( $17,1 \pm 2,4$  células/campo) apresentou menor resposta, seguido pelos grupos MMC ( $18,9 \pm 4,5$  células/campo) e AT+MMC ( $19,1 \pm 3,1$  células/campo) ( $p = 0,001$ ) (figuras 13 e 14, tabela 3).

Figura 13 – Contagem de polimorfonucleares (HE) ao longo do estudo.



Valores de  $p$  são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

Tabela 3 – Caracterização da resposta inflamatória com coloração HE ao longo do estudo.

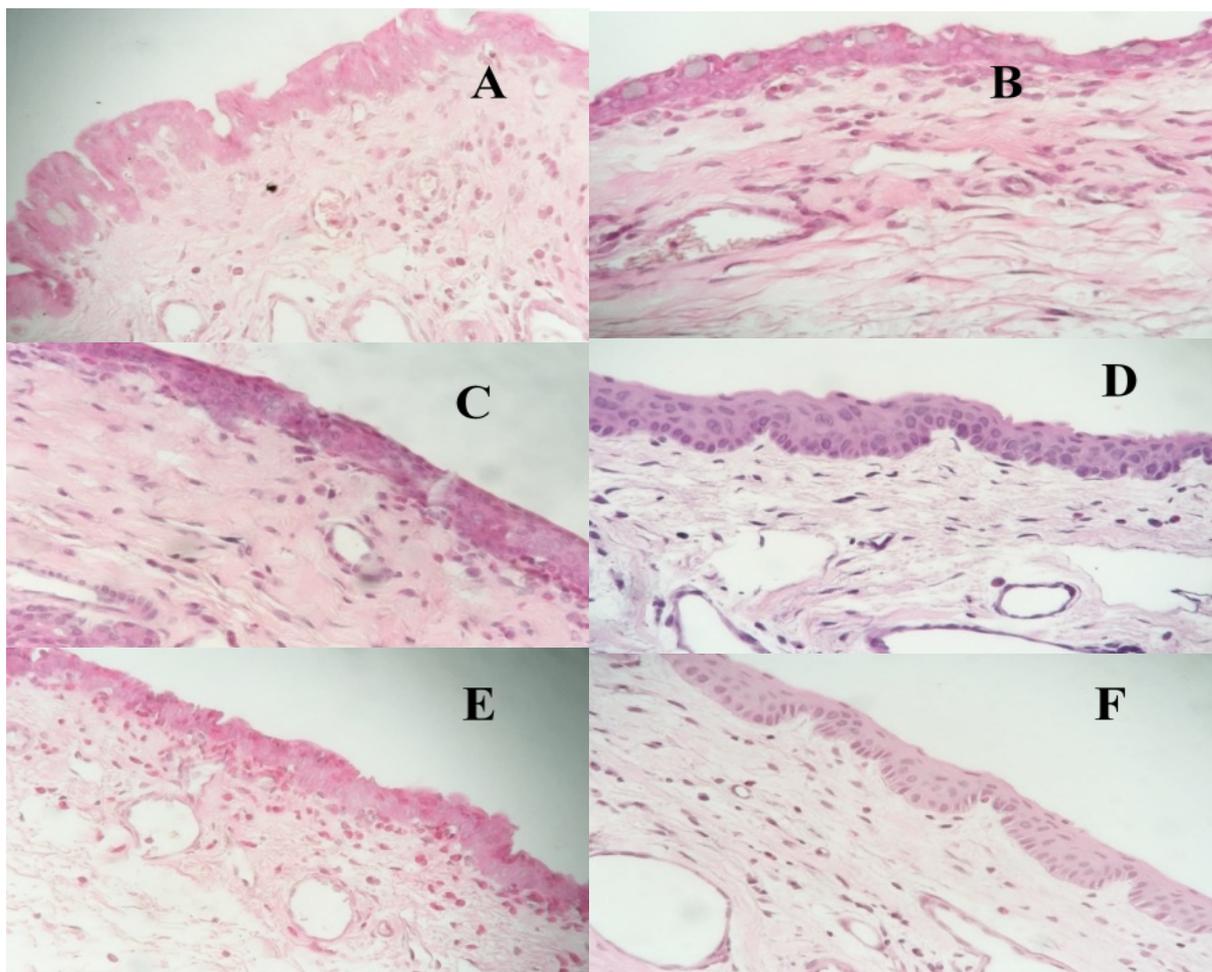
Grupo	Fase			Comparação fases (valor de p)
	3º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=26,4 ± 2,0 Md = 26,7	M=23,3 ± 2,8 Md = 24,0	M=20,0 ± 1,7 Md = 21,0	<0,001
MMC	M=22,5 ± 2,3 Md = 21,0	M=19,3 ± 2,2 Md = 18,7	M=18,9 ± 4,5 Md = 18,7	<0,001
AT	M=22,1 ± 2,3 Md = 22,0	M=21,5 ± 2,0 Md = 21	M=24,9 ± 4,5 Md = 23,3	<0,001
AT+MMC	M=20,9 ± 3,7 Md = 19,3	M=18,0 ± 1,9 Md = 17,3	M=19,1 ± 3,1 Md = 18,7	<0,001
Bevacizumabe	M=25,3 ± 2,2 Md = 25,0	M=24,4 ± 2,1 Md = 23,3	M=21,2 ± 5,3 Md = 23,0	<0,001
Bevacizumabe+MMC	M=20,2 ± 1,3 Md = 20,0	M=18,3 ± 1,2 Md = 19,0	M=17,1 ± 2,4 Md = 18,0	<0,001

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valores referentes a células/campo

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

Figura 14 – Cortes histológicas (HE) do globo ocular na região conjuntival de coelhos submetidos a cirurgia experimental analisando a contagem de polimorfonucleares.



Análise da presença de células polimorfonucleares no 14DPO dos grupos: **A**, controle; **B**, MMC; **C**, AT; **D**, AT+MMC; **E**, Bevacizumabe; **F**, Bevacizumabe+MMC.

## 4.5 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

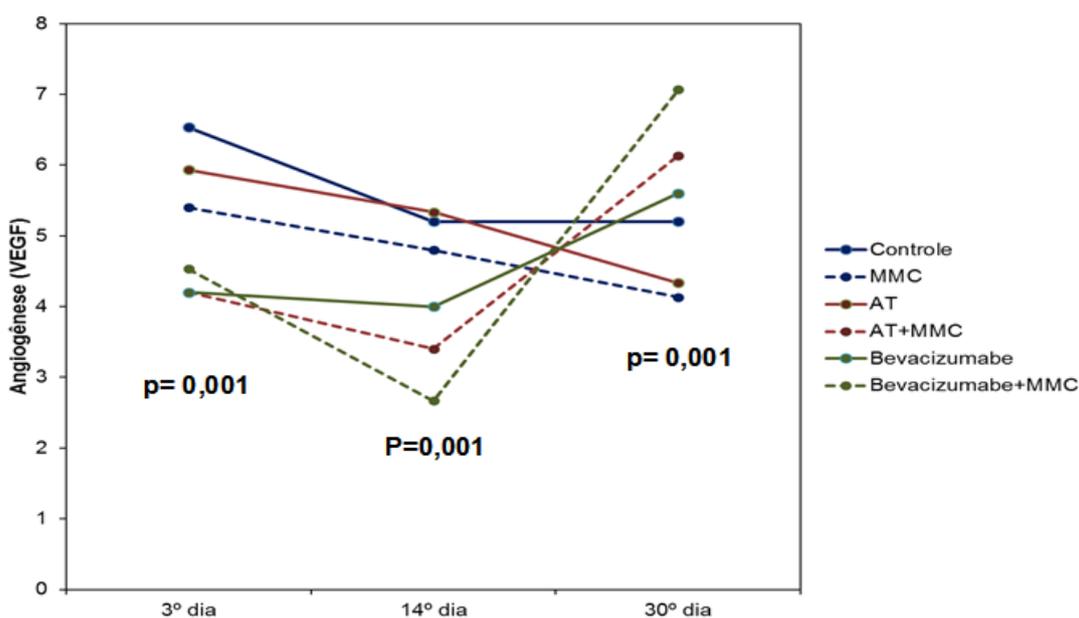
Por intermédio da avaliação imunohistoquímica pela marcação do VEGF durante o estudo (figuras 15 e 16), a comparação entre as fases de cada grupo mostrou significância em todos eles ( $p=0,005$ ).

Na análise dos resultados entre os grupos, no 3DPO, o grupo com maior proliferação vascular foi o grupo controle ( $6,5 \pm 1,6$  vasos/campo), os de menor resposta foram o grupo AT+MMC ( $4,2 \pm 0,9$  vasos/campo), Bevacizumabe ( $4,2 \pm 1,5$  vasos/campo), seguidos pelo Bevacizumabe+MMC ( $4,5 \pm 1,6$  vasos/campo) ( $p=0,001$ ).

Já os resultados no 14DPO mostraram o grupo Bevacizumabe+MMC ( $2,7 \pm 1,5$  vasos/campo) com menor resposta vascular, seguido do grupo AT+MMC ( $3,4 \pm 1,0$  vasos/campo). Para este período, os grupos de pior resultado foram o Controle ( $5,2 \pm 1,7$  vasos/campo) e AT ( $5,3 \pm 1,5$  vasos/campo) ( $p=0,001$ ).

No 30DPO, o grupo MMC ( $4,1 \pm 1,2$  vasos/campo) apresentou menor proliferação vascular que os outros grupos, contudo os grupos AT+MMC ( $6,1 \pm 1,8$  vasos/campo) e Bevacizumabe+MMC ( $7,1 \pm 2,1$  vasos/campo) nesta fase tardia mostraram piores resultados ( $p=0,001$ ) (tabela 4).

Figura 15 – Achados referentes a proliferação vascular ao longo do estudo.



Valores de  $p$  são referentes a comparação entre os grupos em cada fase.

Tabela 4 – Caracterização da resposta vascular pela marcação do VEGF ao longo do estudo.

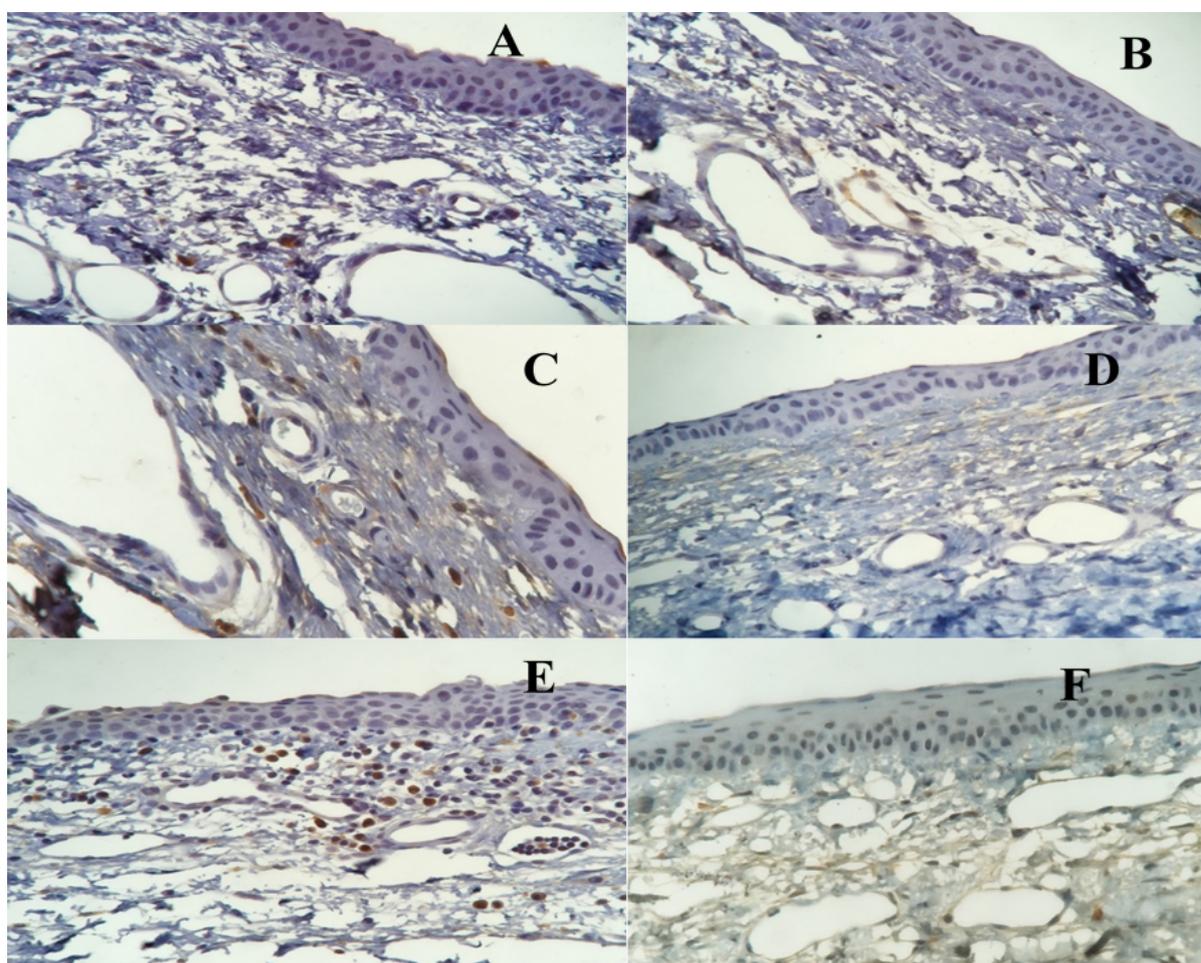
Grupo	Fase			Comparação fases (valor de p)
	3º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=6,5 ± 1,6 Md = 7,0	M=5,2 ± 1,7 Md = 5,0	M=5,2 ± 0,5 Md = 5,3	<b>0,005</b>
MMC	M=5,4 ± 1,1 Md = 5,7	M=4,8 ± 1,1 Md = 5,0	M=4,1 ± 1,2 Md = 3,7	<b>0,005</b>
AT	M=5,9 ± 0,9 Md = 5,7	M=5,3 ± 1,5 Md = 5,7	M=4,3 ± 1,1 Md = 4,0	<b>0,005</b>
AT+MMC	M=4,2 ± 0,9 Md = 4,0	M=3,4 ± 1,0 Md = 3,3	M=6,1 ± 1,8 Md = 5,3	<b>0,005</b>
Bevacizumabe	M=4,2 ± 1,5 Md = 4,0	M=4,0 ± 1,9 Md = 3,0	M=5,6 ± 1,6 Md = 6,3	<b>0,005</b>
Bevacizumabe+MMC	M=4,5 ± 1,6 Md = 4,3	M=2,7 ± 1,5 Md = 2,3	M=7,1 ± 2,1 Md = 8,0	<b>0,005</b>

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valores referentes a vasos/campo

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

Figura 16 – Cortes histológicos (avaliação imunohistoquímica) da conjuntiva de coelhos submetidos a cirurgia experimental, analisando a deposição do cromógeno marrom no endotélio vascular no 14DPO.



Grupo: A, controle; B, MMC; C, AT; D, AT+MMC; E, Bevacizumabe; F, Bevacizumabe+MMC.

## 5 DISCUSSÃO

---

O sucesso da cirurgia fistulante de glaucoma é dependente do grau de cicatrização pós-operatória. A principal causa de falência é o desenvolvimento de fibrose na conjuntiva e episclera secundário à proliferação de fibroblastos e depósito de colágeno no local da fístula. Frequentemente, isto induz falha do controle pressórico no pós-operatório com subsequente lesão do nervo óptico.<sup>32</sup>

Para melhorar o resultado, vários agentes antifibróticos são aplicados em combinação com a trabeculectomia. Os agentes adjuvantes mais utilizados são 5-FU e MMC. Embora a eficácia destes agentes tenha sido demonstrada em vários estudos, ainda há preocupações com efeitos adversos potencialmente ameaçadores da visão, tais como hipotonia associada à maculopatia, bolha avascular fina cística, infecção cirúrgica e endoftalmite.<sup>33, 43, 44</sup>

Ao contrário de outros procedimentos cirúrgicos, o objetivo na trabeculectomia é a ferida parcialmente cicatrizada no pós-operatório. A cicatrização completa da incisão é considerada falência cirúrgica. Essa falência pode ocorrer por várias razões, mas as causas mais comuns são alterações na conjuntiva e episclera. Portanto, a modulação do processo de cicatrização tem importância no sucesso da cirurgia.<sup>45</sup>

Os corticosteroides suprimem a fase inflamatória pela inibição das funções dos macrófagos, como fagocitose e liberação de enzimas (colagenase, ativador de plasminogênio e fatores de crescimento). Na fase de regeneração, inibem a conversão de fosfolípidios da membrana em ácido araquidônico, que atuam com fator quimiotático. Além disso, também inibem a permeabilidade vascular e a proliferação de fibroblastos.<sup>14</sup> O uso do Acetato de Triancinolona, na oftalmologia, é feito com segurança e eficácia no tratamento de uveíte, edema macular diabético, edema macular após oclusão de veia central da retina e neovascularização da coroide.<sup>36, 45</sup>

A razão para a escolha do AT, no presente estudo, se deu pelo seu potencial de ação ser equivalente a cinco vezes o do cortisol, além disso, por ser um corticoide de depósito (pouco solúvel em água), é possível conseguir concentrações mais dura-

douras deste fármaco no local da trabeculectomia. Por ser medicação já bastante utilizada na oftalmologia, facilita seu uso em indicações alternativas como modulador de cicatrização na cirurgia do glaucoma.

VEGF é uma molécula vital na resposta à cicatrização de feridas. Não só é poderoso indutor de angiogênese, como também é fator de crescimento e mediador na cascata de transdução de sinal levando à migração de fibroblastos e proliferação de células inflamatórias.<sup>21, 32</sup> Deste modo, bloquear o papel central deste composto na angiogênese e reparação de ferida pode conduzir à redução na formação de tecido cicatricial e à atenuação geral da resposta de cicatrização.

Na oftalmologia, os estudos clínicos vêm encorajando o uso do Bevacizumabe via injeção intravítrea para diferentes desordens oculares como degeneração macular relacionada à idade, retinopatia diabética proliferativa grave, neovascularização de íris.<sup>29-31</sup> Inicialmente, as publicações relativas a Bevacizumabe como adjuvante na cirurgia fistulante foram em casos de glaucomas refratários como o glaucoma neovascular, glaucoma secundário a uveíte, glaucoma após cirurgia de retina.<sup>46</sup> Nesta pesquisa, o anti-VEGF escolhido foi o Bevacizumabe pelo menor custo entre os outros da mesma classe, já que, além da resposta na modulação da cicatrização, o custo/efetividade é fator importante da escolha de novo adjuvante; além disso, por não ser um fármaco padronizado para oftalmologia pelo FDA e ANVISA, também foi utilizado de maneira experimental neste estudo.

A eficácia dos agentes antifibróticos tem sido testada em animais por meio de modelos experimentais de trabeculectomias.<sup>32, 47, 48</sup> O modelo de cirurgia experimental escolhido, no presente estudo, foi o coelho, por apresentar estruturas oculares de maiores dimensões, muitas delas com padrões anatômicos muito próximos daqueles observados em seres humanos. Além disso, os resultados cirúrgicos como os aspectos pós-operatórios e as possíveis complicações, podem ser mais evidentes e melhor avaliados. Esses animais também apresentam boa relação custo/efetividade.

O presente estudo avaliou o uso do Acetato de Triancinolona e Bevacizumabe isolados e associados à Mitomicina C na trabeculectomia a fim de observar aspectos clínicos da cirurgia, pressão intraocular pós-operatória e a resposta cicatricial, avaliando a segurança e eficácia desses agentes alternativos à cirurgia fistulante.

A avaliação da pressão intraocular mostrou que a medida pré-operatória foi maior que as medidas pós-operatórias em todos os grupos analisados; contudo, não houve diferença entre eles até o 14DPO. Esse achado está em concordância com a pesquisa de Mermarzadeh *et al.* (2009),<sup>32</sup> que também não evidenciou diferença entre os grupos em relação à pressão, justificando que, como os animais não tinham glaucoma prévio, já apresentavam pressão normal pré-operatória; conseqüentemente, não apresentaram grandes variações no pós-operatório. Já no 30DPO, o grupo Bevacizumabe+MMC apresentou menores níveis pressóricos, sugerindo a ação positiva desta associação na trabeculectomia em diminuir a Po pré-operatória. O grupo AT+MMC apresentou resultados similares ao grupo MMC, mostrando que, nesse critério, não houve superioridade dessa associação à monoterapia. O uso isolado de AT e Bevacizumabe, mostrou menores índices de Po em relação ao grupo controle.

A utilização de Acetato de Triancinolona na Oftalmologia é associada a elevação pressórica induzida pelo uso de corticoide, sua injeção subconjuntival pode causar este aumento por vários meses. Acredita-se que essa elevação ocorra secundariamente à redução na facilidade de escoamento do humor aquoso pela malha trabecular.<sup>37</sup> Os resultados do presente estudo não demonstraram aumentos da Po nos grupos AT e AT+MMC, dados concordantes com Hogewind *et al.* (2013), sugerindo que o efeito no aumento da pressão induzido pelo corticoide na malha trabecular seja compensado pela diminuição pressórica secundária à trabeculectomia.<sup>36</sup>

Os grupos das monoterapias de AT e Bevacizumabe não apresentaram resultados promissores na avaliação da bolha fistulante. Houve superioridade em poucos critérios ao grupo controle, como também resultados inferiores ao grupo MMC. Na análise da associação AT+MMC houve melhores resultados que no grupo MMC no critério altura da bolha, nos outros parâmetros os resultados foram similares.

O uso do Bevacizumabe adjuvante à MMC mostrou os melhores resultados clínicos ao final do estudo, em relação à área central, à área máxima e à altura máxima da bolha. Isso demonstra, neste modelo experimental, que essa associação de fármacos garantiu bolhas mais altas e difusas. Já na avaliação da vascularização, houve diferença entre os grupos até fase intermediária da pesquisa, com menores índices nos grupos que utilizaram a MMC.

Em 1986, Giangiaco *et al.* fizeram o primeiro relato do uso de AT na cirurgia de glaucoma. Realizaram trabeculectomias em pacientes com glaucoma não controlado com medicação máxima. Em 12 olhos, uma semana antes da cirurgia, foi aplicada AT subconjuntival (4mg), em dois olhos no dia da cirurgia e em um olho dois dias após o procedimento. Ao final do acompanhamento, 14 olhos apresentaram sucesso cirúrgico ( $Po < 18\text{mmHg}$ ), e bolhas difusas ao exame.<sup>49</sup> Esse estudo piloto, apesar de não apresentar grupo controle, levantou a hipótese da importância do AT como modulador nas trabeculectomias.

No presente estudo, quando o AT foi utilizado em monoterapia, não demonstrou bons resultados em relação às associações e a MMC isolada, em discordância com Hogewind *et al.* (2013) que investigaram, em pesquisa retrospectiva e controlada, a eficácia de AT subtenoniana e MMC em monoterapia no sucesso das trabeculectomias (n=64). Houve taxa de sucesso cirúrgico similar entre os grupos no acompanhamento de 5 anos, sugerindo que AT poderia ser usado com adjuvante na cirurgia fistulante.<sup>36</sup> Essa diferença de resultados é justificada pela dosagem do AT utilizada nas pesquisas. A dose escolhida nesta pesquisa foi de 4mg de Acetato de Triancinolona subconjuntival, tentando-se utilizar baixa dosagem para evitar possíveis efeitos na Po no pós-operatório. E no trabalho de Hogewind *et al.*, utilizaram a dose de 40 mg intraoperatória e, depois, mais três doses de 20 mg no pós-operatório.

A maioria das publicações avaliou o uso da associação AT e MMC. Tham *et al.* (2006), em série de casos, injetaram AT (1,2mg) diretamente na ampola fistulante de três olhos submetidos à facotrabeculectomia e três à trabeculectomia com MMC; e cinco, à revisão de trabeculectomia com 5-FU. Relataram diminuição da Po sem necessidade de medicação até 3 meses e não observaram sinais de perda endotelial ou progressão da catarata.<sup>50</sup> Em 2009, outra série de casos avaliou o uso de AT retrobulbar (20mg) nas trabeculectomias com MMC. Apresentaram diminuição significativa da Po em 6 meses ( $p < 0,001$ ) sem necessidade de medicação hipotensora e não houve complicações (infecção, hipotonia, ulceração da conjuntiva).<sup>51</sup> Apesar de serem apenas relatos de casos, esses resultados corroboram o efeito positivo da associação desses moduladores na trabeculectomia.

Já em estudo prospectivo randomizado e controlado, avaliou-se a eficácia da injeção de AT subtenoniana (20mg) no sucesso das trabeculectomias (com MMC) em

glaucomas secundários. Sucesso completo foi de 65,4% no grupo do AT e 63% no grupo controle ( $p=0,77$ ). As características da ampola fistulante foram similares em ambos os grupos ( $p>0,40$ ), e não houve diferenças de  $P_o$  no seguimento ( $p>0,05$ ).<sup>52</sup> Os achados deste estudo foram similares, quando AT foi associado à MMC nas trabeculectomias, à recente série retrospectiva de casos que analisou a administração de AT intracamerar (0,1-0,3 mL 4mg/mL) adjuvante a trabeculectomia em uso de MMC. O sucesso completo ( $P_o<18\text{mmHg}$ ) foi de 68,4% no grupo estudado e 52,4% no grupo controle, já o sucesso parcial ( $P_o<18\text{mmHg}$  com medicação antiglaucomatosa) foi de 31,6% e 47,6%, respectivamente. Também não houve aumento das complicações no grupo do AT ( $p>0,05$ ).<sup>53</sup> Esses resultados estão em concordância com os encontrados na presente pesquisa que mostraram diminuição pressórica nos pós-operatório e bom aspecto clínico da trabeculectomia no grupo AT+MMC, mas com resultados similares ao grupo que utilizou MMC isolado.

Esses resultados positivos como também os já publicados em relação ao uso de AT com adjuvante às trabeculectomias devem, no entanto, ser considerados com cautela, porque não obtiveram evidências suficientes para um seguimento a longo prazo, as doses utilizadas foram diferentes, como também a via de administração; e as conclusões foram baseadas principalmente em série retrospectiva de casos.

O grupo Bevacizumabe, no presente estudo, não obteve resultados promissores em relação aos outros grupos, discordando de estudos já publicados. Em pesquisa experimental ( $n=44$ ), coelhos operados bilateralmente, foi utilizado Bevacizumabe (25mg/mL) após trabeculectomia e avaliada resposta à cicatrização. Não houve diferença entre o grupo controle e o grupo estudado em relação às medidas de  $P_o$ , contudo o último apresentou bolhas maiores e mais difusas que o controle ( $p<0,05$ ).<sup>54</sup> Memarzadeh *et al.* (2009), relataram resultados semelhantes em estudo experimental ( $n=42$ ) em coelhos que receberam sete injeções subconjuntivais de Bevacizumabe (1,25mg), 5-FU ou solução salina equilibrada durante os primeiros 14 dias após trabeculectomia. Não houve diferença significativa na média da  $P_o$ , mas o grupo do Bevacizumabe apresentou mais que o dobro do tempo de sobrevivência da bolha ( $p<0,05$ ) em comparação aos outros dois tratamentos.<sup>32</sup> Essa discordância entre resultados pode ser justificada pela concentração maior e também pelo maior número de aplicações do que foi utilizado na presente pesquisa.

Ensaios clínicos também avaliaram a segurança e eficácia do Bevacizumabe na trabeculectomia. No presente estudo, o grupo MMC apresentou melhores resultados que o grupo Bevacizumabe e esse, em alguns critérios clínicos, melhores que o grupo controle. Isso está de acordo com estudo prospectivo, randomizado e comparativo que avaliou 36 olhos com glaucoma não controlado clinicamente que necessitaram de trabeculectomia. Dezoito olhos utilizaram Bevacizumabe (2,5mg/0,1mL) subconjuntival e 18 olhos, MMC (0,02% por 3 min). Na última visita (6 meses), foi observada redução da Po de 34% e 56% no grupo do Bevacizumabe e MMC, respectivamente. O grupo da MMC necessitou de menor quantidade de medicação antiglaucomatosa no pós-operatório, concluindo-se que o uso de Bevacizumabe como adjuvante à trabeculectomia é efetivo no controle da Po, mas com efeito menor ao da MMC.<sup>33</sup>

Outra pesquisa de série de casos não randomizada, prospectiva avaliou por 12 meses dois grupos: submetido a trabeculectomia com 5-fluoruracil (5%) e com múltiplas injeções de Bevacizumabe (1,25mg/0.05mL). Não houve diferença em relação ao aspecto clínico da cirurgia, acuidade visual final e complicações pós-operatórias. Redução de 30% da Po inicial foi conseguida em 86,7% do grupo do 5-FU e 78,1% no grupo do Bevacizumabe.<sup>34</sup> Sengupta *et al.* (2012), mostraram em seus resultados superioridade do Bevacizumabe subconjuntival em relação ao grupo da MMC e do Bevacizumabe tópico.<sup>55</sup>

Em recente estudo prospectivo, randomizado, houve avaliação da eficácia do Bevacizumabe (1,25mg/0,05mL) e MMC com adjuvantes a trabeculectomias. Houve diminuição significativa da Po pré-operatória, mas de forma similar entre os grupos. Houve semelhança entre os aspectos clínicos da bolha, apenas o grupo que utilizou o Bevacizumabe mostrou menores índices de vascularização. Esses resultados sugerem que o Bevacizumabe é tão eficaz quanto a MMC no controle pressórico em 1 ano de acompanhamento. Os dados discordantes da presente pesquisa podem ser explicados pela diferença entre a resposta cicatricial agressiva de coelhos em relação a de seres humanos.<sup>56</sup>

O grupo Bevacizumabe+MMC neste trabalho apresentou melhores resultados nos critérios clínicos da bolha fistulante em relação aos outros grupos, nas fases inicial, intermediária e final do estudo as bolhas se apresentavam mais amplas e difusas. Em concordância com estudo de série de casos não comparativo em pacientes com

glaucomas primários não controlados com medicação; todos foram submetidos a trabeculectomia com MMC associada a injeção subconjuntival de Bevacizumabe (1,25mg/0,05mL) ao final da cirurgia. Após 12 meses de acompanhamento, houve redução da Po ( $p < 0,01$ ), sucesso completo de 71-88% e em 80% da morfologia das bolhas houve boa ou excelente gradação.<sup>39</sup> Apesar de não apresentar grupo controle, esses achados reforçam a importância do bloqueio do VEGF associado a ação antifibrótica da MMC no sucesso das trabeculectomias.

Resultados similares foram encontrados por Kahook *et al.* (2010), que avaliaram trabeculectomias com MMC e MMC em associação a Ranibizumabe, outro anti-VEGF. Houve diferenças significativas na área da bolha periférica ( $p = 0,02$ ), vascularização da bolha periférica ( $p = 0,02$ ) e vascularização conjuntival periférica não associada à bolha ( $p = 0,0003$ ), sendo que o grupo combinado exibiu bolhas mais difusas.<sup>57</sup>

Contudo, outros trabalhos que compararam o uso de MMC isolado e em associação a Bevacizumabe nas cirurgias filtrantes apresentaram diminuição pressórica e boas taxas de sucesso cirúrgico no grupo da associação, mas sem diferença significativa entre os grupos.<sup>40,41</sup> Um desses estudos avaliou pacientes que seriam reoperados de glaucoma justificando a resposta cicatricial mais severa.<sup>40</sup> Suh W *et al* (2013) também não demonstraram superioridade na associação do Bevacizumabe à 5-FU.<sup>58</sup>

Seet *et al.* (2013), desenvolveram em ratos uma análise espaço-temporal das fases na resposta de cicatrização de feridas à cirurgia fistulante. Observaram que a resposta pode ser separada em duas fases distintas. A fase “inflamatória aguda” precoce caracterizada pelo aumento significativo da expressão de VEGF, bem como aumento da infiltração de células inflamatórias. A fase “fibrótica” tardia foi marcada por expressão aumentada do TGF- $\beta$ 2 (*Transforming Growth Factor*) e dos genes da matriz extracelular com redução simultânea na infiltração de células inflamatórias. O aumento da expressão de VEGF durante a fase inicial indicou que a angiogênese é resposta precoce no processo de cicatrização de feridas na trabeculectomia.<sup>59</sup> O conhecimento dessas alterações de expressão celular e molecular é importante não só para definir as fases precoce e tardia da cicatrização de feridas, mas também para determinar a janela terapêutica para a modulação ideal em cada fase.<sup>59</sup> Esses dados cor-

roboram o uso tanto do Acetato de Triancinolona quanto do Bevacizumabe ou no intraoperatório, como foi utilizado no presente estudo, ou no pós-operatório precoce pela ação principal desses moduladores na fase inflamatória aguda.

A resposta à cicatrização nesta pesquisa foi baseada na avaliação do infiltrado de polimorfonucleares como também pela proliferação vascular durante cada fase.

Na fase inicial, o grupo que apresentou menor infiltrado inflamatório foi do Bevacizumabe+MMC, seguido do AT+MMC; os de maior contagem foram os grupos Controle e Bevacizumabe. Na fase intermediária, o grupo do Bevacizumabe mostrou maior presença de células inflamatórias, e os grupos Bevacizumabe+MMC e AT+MMC permaneceram com menor resposta inflamatória. Já na fase final, o grupo AT apresentou maior reação inflamatória; os grupos MMC e AT+MMC, respostas similares, sendo superados pelo grupo Bevacizumabe+MMC com menor infiltrado inflamatório. Esses achados sugerem ação concomitante dos agentes associados na diminuição da resposta inflamatória ao longo do estudo.

Em relação ao critério angiogênese, no 3DPO os grupos Bevacizumabe e AT+MMC apresentaram menor proliferação vascular; o grupo Bevacizumabe+MMC mostrou menor resposta do que o da MMC. No 14DPO, o grupo Bevacizumabe+MMC foi o de menor proliferação vascular, seguido pelo grupo AT+MMC. Ao final do estudo, o grupo de menor resposta foi o da MMC; e os grupos AT+MMC e Bevacizumabe+MMC, de piores resultados. Esses resultados apontam para ação sinérgica dos adjuvantes na fase intermediária da angiogênese, contudo essa ação não foi observada ao final do estudo.

Não identificamos estudos prévios relatando o efeito na cascata de cicatrização do AT e AT+MMC na trabeculectomia em coelhos. A monoterapia apresentou menor resposta inflamatória no 3DPO, contudo, ao final da pesquisa, foi o grupo com maior infiltrado inflamatório. Já a associação dos agentes mostrou melhores resultados que o grupo da MMC no 3DPO e 14DPO, apresentando resultados similares a ele no 30DPO. Na avaliação da proliferação vascular, a monoterapia não apresentou bons resultados; já o grupo AT+MMC apontou menor resposta a angiogênese no 3DPO em relação aos outros grupos e no 14DPO foi o segundo menor índice.

Estudo experimental avaliou o uso de implante intravítreo de Dexametasona, como adjuvante a trabeculectomia, mostrando menor depósito de colágeno e maior sobrevida da cirurgia em relação ao grupo controle, contudo o grupo da MMC apresentou melhores resultados.<sup>60</sup> Esses resultados em associação aos presentes achados reforçam a ação positiva dos corticoides na modulação da cicatrização na cirurgia do glaucoma, contudo tanto a Dexametasona como o Acetato de Triancinolona não foram superiores ao antifibrótico padrão, a MMC. Entretanto, não houve avaliação da associação dos adjuvantes, como no vigente estudo, que analisou a associação AT+MMC, mostrando maior modulação da cicatrização do que estes agentes isolados nas fases inicial e intermediária tanto em relação ao infiltrado inflamatório como a resposta vascular. Esta ação positiva do uso do corticoide na trabeculectomia é corroborada tanto por relato de que seu uso tópico no pós-operatórios aumenta significativamente o sucesso cirúrgico por inibição da cicatrização de feridas como resultado da supressão da inflamação e proliferação de fibroblastos<sup>61</sup>; como também pesquisa em seres humanos por cultura de fibroblasto da cápsula de Tenon mostraram que eles inibem a ligação e proliferação celular.<sup>62</sup>

Contudo, o resultado não promissor do AT isolado e o bom resultado do AT+MMC apenas até fase intermediária nesse modelo animal pode ser justificado pela baixa dosagem de 4 mg desse corticoide utilizada neste estudo.

How *et al.* (2010), sugeriram efeito sinérgico do Bevacizumabe associado ao 5-FU, mostrando melhor resposta antifibrótica do que esses agentes em monoterapia, achados em concordância à presente pesquisa. Houve atenuação da expressão da fibronectina e colágeno I ( $p < 0,05$ ).<sup>17</sup> Outro estudo experimental mostrou que houve diminuição no calibre e densidade vascular no início do processo cicatricial quando foi utilizado o Bevacizumabe ( $p = 0,02$ ), mas não houve diferença na contagem de células inflamatórias em relação ao controle. Já na fase tardia, houve diminuição em 13% ( $p = 0,0001$ ) na área de colágeno no sítio cirúrgico em relação ao grupo controle.<sup>54</sup> Assim, Bevacizumabe melhorou o resultado da cirurgia do glaucoma inibindo a angiogênese durante a fase inicial de cicatrização e reduzindo a fibrose em estágios posteriores em modelo experimental, consolidando a importância do bloqueio do VEGF na atenuação deste processo. Van Berger *et al.* (2015), mostraram, em modelo animal, que as vias de administração subconjuntival, intracamerar e intravítrea foram similares

na redução do processo de angiogênese; além disso, houve efeito benéfico na associação Bevacizumabe e MMC no sucesso cirúrgico, com menor tempo de administração da MMC, eliminando seu efeito de toxicidade na córnea.<sup>63</sup> Os resultados acima estão em concordância com os achados favoráveis quando houve associação do Bevacizumabe à MMC no presente modelo experimental de cicatrização de feridas.

O uso do Bevacizumabe em associação à MMC apresentou menor resposta inflamatória ao longo do estudo em relação aos outros grupos. Apesar da resposta positiva no critério inflamação, a expressão dos marcadores de angiogênese desse grupo foi menor apenas na fase intermediária em relação aos outros. Isso pode ser justificado primeiramente pela resposta à cicatrização de feridas no coelho que, quando comparada à de seres humanos, é conhecida por ser mais agressiva e exagerada e implicar em falha rotineira dos locais cirúrgicos de trabeculectomia dentro de poucos dias a semanas.<sup>64</sup> Como também há possibilidade de que o efeito sinérgico entre Bevacizumabe e MMC tenha sido sobre a atenuação da cascata de sinalização inflamatória regulada pelo VEGF e não só pelo bloqueio à angiogênese.

Cheng *et al.* (2015), em modelo experimental de ratos utilizaram Bevacizumabe na modulação da cicatrização e foi encontrado maior sucesso cirúrgico e menores índices de complicação no grupo que utilizou esse modulador. Demonstrou também que o Bevacizumabe não só atuou no bloqueio do VEGF e seus receptores, mas houve inibição de fatores inflamatórios como TGF $\beta$ .<sup>65</sup> Da mesma forma, Memarzadeh *et al.* (2009), sugeriram que, não havendo diferença significativa na avaliação clínica em relação a vascularização nos grupos controle, Bevacizumabe e 5-FU; o anti-VEGF expressou sua ação maior na resposta inflamatória em detrimento à resposta antiangiogênica.<sup>32</sup>

Esta pesquisa não avaliou o tempo de sobrevida da bolha fistulante, critério utilizado em alguns estudos experimentais desta cirurgia. Ele é definido por uma aparência cicatrizada, plana e vascularizada da bolha. Contudo, avaliação clínica utilizando o Sistema de Graduação da Bolha de Moorfields analisou a extensão, altura e grau de vascularização do local da cirurgia, má pontuação desses parâmetros indiretamente apontariam para o critério de sobrevida. Outra limitação foi o número pequeno de olhos na fase final do estudo, contudo esse número é concordante com publicações prévias.<sup>32, 54, 65</sup>

Segundo achados deste trabalho, a Mitomicina C permanece um agente anti-proliferativo eficaz que possui efeito inibitório na cascata da cicatrização, consequentemente há diminuição da formação da cicatriz, levando a melhor função e sobrevida da bolha fistulante. Apesar da literatura<sup>12, 14, 15</sup> apontar maior risco de escape de humor aquoso, hipotonia e endoftalmite, não encontramos aumento das complicações nos grupos que utilizaram a MMC.

O processo de cicatrização de feridas é complexo e envolve múltiplos caminhos vasculares e celulares com interações cruzadas que não são totalmente compreendidos. Além disso, o glaucoma representa um conjunto de doenças de características e etiologias distintas, necessitando de diferentes opções terapêuticas na modulação da cicatrização para atingir o melhor controle pressórico e garantir, a longo prazo, visão a seus portadores. A cirurgia de trabeculectomia com uso concomitante de 5-FU ou MMC é técnica bem reconhecida e sucedida; contudo, pelos motivos acima descritos, esta pesquisa explorou o uso de outros agentes para aumentar o sucesso cirúrgico e, ao mesmo tempo, diminuir o risco de complicações pós-operatórias.

É provável que múltiplos agentes, usados simultaneamente ou sequencialmente, possam ser necessários para a modulação ideal por causa da natureza multifatorial da cicatrização de feridas. O presente estudo aponta para ação sinérgica do Bevacizumabe e Acetato de Triancinolona à MMC com bolhas mais amplas e difusas e menor infiltrado inflamatório até o final do seguimento, e menor proliferação vascular em estágio intermediário do acompanhamento neste modelo animal.

Esses achados sugerem possibilidades alternativas de terapia adjuvante segura que possam melhorar a eficácia da cirurgia e, portanto, o prognóstico dos pacientes com glaucoma. Contudo, grandes ensaios clínicos prospectivos ainda são necessários com objetivo de avaliar combinações ideais, dose e via de administração dos tratamentos que produzam o melhor resultado cirúrgico com mínimos efeitos colaterais.

## 6 CONCLUSÕES

---

- 1- Ao final do estudo, a combinação Bevacizumabe+MMC apresentou maior efeito hipotensor, demonstrando ação positiva desses agentes associados no controle da pressão intraocular.
- 2- As bolhas fistulantes mais amplas, altas e difusas foram observadas no grupo Bevacizumabe+MMC em toda pesquisa. Já o grupo AT+MMC superou o grupo MMC até fase intermediária, igualando-se no final do seguimento. Os menores índices de vascularização foram encontrados nos grupos que utilizaram a MMC.
- 3- Constatou-se menor infiltrado inflamatório ao longo do estudo na associação Bevacizumabe+MMC. O grupo AT+MMC foi o segundo com menor resposta inflamatória até fase intermediária, equivalendo-se a MMC ao final da pesquisa.  
  
Contudo, a melhor resposta à proliferação vascular do grupo Bevacizumabe+MMC foi encontrada apenas no 14DPO seguida pelo grupo AT+MMC. Ao final do acompanhamento, o grupo MMC demonstrou menor proliferação vascular.
- 4- A associação Bevacizumabe a MMC é efetiva e segura como modulador da cicatrização da trabeculectomia neste modelo animal; como também a associação Acetato de Triancinolona a MMC, mas com efeito menor. Os moduladores alternativos isolados não foram tão eficazes como a MMC em monoterapia em toda a pesquisa.

## REFERÊNCIAS

---

1. Fan BJ, Wiggs JL. Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J Clin Invest*. 2010;120:3064-72.
2. Hennis A, Wu SY, Nemesure B, Honkanen R, Leske MC; Barbados Eyes Studies Group. Awareness of incident open-angle glaucoma in a population study: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology*. 2007;114:1816-21.
3. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:262-7.
4. Grigera DE, Mello PA, Barbosa WL, Casiraghi JF, Grossmann RP, Peyret A. Level of agreement among Latin American glaucoma subspecialists on the diagnosis and treatment of glaucoma: results of an online survey. *Arq Bras Oftalmol*. 2013;76:163-9.
5. Civan MM, Macknight AD. The ins and outs of aqueous humour secretion. *Exp Eye Res*. 2004;78:625-31.
6. Kiel JW, Hollingsworth M, Rao R, Chen M, Reitsamer HA. Ciliary blood flow and aqueous humor production. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30:1-17.
7. Gabelt BT, Kaufman PL. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 2005;24:612-37.
8. Mark HH. Aqueous Humor Dynamics in Historical Perspective. *Surv Ophthalmol*. 2010;55:89-100.
9. Harasymowycz P, Birt C, Gooi P, Heckler L, Hutnik C, Jinapriya D, et al. Medical Management of Glaucoma in the 21st Century from a Canadian Perspective. *J Ophthalmol*. 2016;2016:6509809.
10. Cairns JE. Trabeculectomy: preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol*. 1968;66:673-9.
11. Watson PG. Trabeculectomy. A modified Ab. Externo technique. *Ann Ophthalmol*. 1970;2:199-206.
12. Razeghinejad MR, Fundenberg SJ, Spaeth GL. The Changing Conceptual Basis of Trabeculectomy: A Review of Past and Current Surgical Techniques. *Surv Ophthalmol*. 2012;57:1-25.
13. Landers J, Martin K, Sarkies N, Bourne R, Watson P. A Twenty-Year Follow-up Study of Trabeculectomy: Risk Factors and Outcomes. *Ophthalmology*. 2012;119:694-702.
14. Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol*. 2003;48:314-46.
15. Cordeiro MF, Chang L, Lim KS, Daniels JT, Pleass RD, Siriwardena D, et al. Modulating conjunctival wound healing. *Eye*. 2000;14:536-47.
16. Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyszyn TM, Bergdall VK, Dipietro LA. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*. 2008; 88:579-90.
17. How A, Chua JL, Charlton A, Su R, Lim M, Kumar RS, et al. Combined treatment with bevacizumab and 5-fluorouracil attenuates the postoperative scarring response after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:928-32.
18. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-76.

19. Kim M, Lee C, Payne R, Yue BY, Chang JH, Ying H. Angiogenesis in glaucoma filtration surgery and neovascular glaucoma: A review. *Surv Ophthalmol.* 2015;60:524-35.
20. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 2011;2:1097-105.
21. Pożarowska D, Pożarowski P. The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41:311-16.
22. Lockwood A, Brocchini S, Khaw PT. New developments in the pharmacological modulation of wound healing after glaucoma filtration surgery. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;13:65-71.
23. Joshi AB, Parrish RK, Feuer WF. 2002 Survey of the American Glaucoma Society: Practice preferences for glaucoma surgery and antifibrotic use. *J Glaucoma.* 2005;14:172-4.
24. Smith S, D'Amore PA, Dreyer EB. Comparative toxicity of mitomycin C and 5-fluorouracil in vitro. *Am J Ophthalmol.* 1994;118:332-7.
25. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Grierson I, Schultz G, McGorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol.* 1993;111:263-7.
26. Van Bergen T, Van de Velde S, Vandewalle E, Moons L, Stalmans I. Improving patient outcomes following glaucoma surgery: state of the art and future perspectives. *Clin Ophthalmol.* 2014;8:857-67.
27. Ichhpujani P, Ramasubramanian A, Kaushik S, Pandav SS. Bevacizumab in glaucoma: a review. *Can J Ophthalmol.* 2007;42:812-5.
28. Popescu V, Pricopie S, Totir M, Iancu R, Yasyn S, Alexandrescu C. Clinical use of Bevacizumab in treating refractory glaucoma. *J Med Life.* 2015;8:8-12
29. Rich RM, Rosenfeld PJ, Puliakit CA, Dubovy SR, Davis JL, Flynn HW Jr, et al. Short-term safety and efficacy of intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Retina.* 2006;26:495-511.
30. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology.* 2006;113:1695.e1-15.
31. Wakabayashi T, Oshima Y, Sakaguchi H, Ikuno Y, Miki A, Gomi F, et al. Intravitreal bevacizumab to treat iris neovascularization and neovascular glaucoma secondary to ischemic retinal diseases in 41 consecutive cases. *Ophthalmology.* 2008;115:1571-80.
32. Memarzadeh F, Varma R, Lin LT, Parikh JG, Dustin L, Alcaraz A, et al. Postoperative use of bevacizumab as an antifibrotic agent in glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:3233-7.
33. Nilforushan N, Yadgari M, Kish SK, Nassiri N. Subconjunctival bevacizumab versus Mitomycin C Adjunctive to Trabeculectomy. *Am J Ophthalmol.* 2012;153:352-7.
34. Jurkowska-Dudzinska J, Kosior-Jarecka E, Zarnowski T. Comparison of the use of 5-fluorouracil and bevacizumab in primary trabeculectomy: results at 1 year. *Clin Exp Ophthalmol.* 2012;40:135-42.
35. Hosseini H, Mehryar M, Farvardin M. Focus on triamcinolone acetonide as an adjunct to glaucoma filtration surgery. *Med Hypotheses.* 2007;68:401-3.
36. Hogewind BF, Pijl B, Hoyng CB, Theelen T. Purified triamcinolone acetonide as antifibrotic adjunct in glaucoma filtering surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251:1213-8.

37. Kalina PH, Erie JC, Rosenbaum L. Biochemical quantification of triamcinolone in subconjunctival depots. *Arch Ophthalmol*. 1995;113:867-9.
38. Zaka-ur-Rab S, Mahmood S, Shukla M, Zakir SM, Khan BA, Owais M. Systemic absorption of triamcinolone acetonide after posterior sub-Tenon injection. *Am J Ophthalmol*. 2009;148:414-9.
39. Biteli LG, Prata TS. Subconjunctival bevacizumab as an adjuvante in first-time filtration surgery for patients with primary glaucomas. *Int Ophthalmol*. 2013;33:741-6.
40. Saeed AM, AboulNasr TT. Subconjunctival bevacizumab to augment trabeculectomy with mitomycin C in the management of failed glaucoma surgery. *Clin Ophthalmol*. 2014;15:1745-55.
41. Kiddee W, Orapiriyakul L, Kittigoonpaisan K, Tantisarasart T, Wangsupadilok B. Efficacy of adjunctive subconjunctival bevacizumab on the outcomes of primary trabeculectomy with mitomycin C: a prospective randomized placebo-controlled trial. *J Glaucoma*. 2015;24:600-6.
42. Wells AP, Crowston JG, Marks J, Kirwan JF, Smith G, Clarke JC, et al. A pilot study of a system for grading of drainage blebs after glaucoma surgery. *J Glaucoma*. 2004;13:454-60.
43. Lamping KA, Belkin JK. 5-Fluorouracil and mitomycin C in pseudophakic patients. *Ophthalmology*. 1995;102:70-5.
44. Cheung JC, Wright MM, Murali S, Pederson JE. Intermediate-term outcome of variable dose mitomycin C filtering surgery. *Ophthalmology*. 1997;104:143-9.
45. Tao Y, Jonas JB. Intravitreal Triamcinolone. *Ophthalmologica* 2011;225:1-20.
46. Marey HM, Ellakwa AF. Intravitreal bevacizumab with or without mitomycin C trabeculectomy in the treatment of neovascular glaucoma. *Clin Ophthalmol*. 2011;5:841-5.
47. Sherwood MB, Esson DW, Neelakantan A, Samuelson DA. A new model of glaucoma filtering surgery in the rat. *J Glaucoma*. 2004;13:407-12.
48. Bair JS, Chen CW. Trabeculectomy with multiple applications of mitomycin-C in monkeys with experimental glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther*. 1997;13:115-28.
49. Giangiacomo J, Dueker DK, Adelstein E. The effect of preoperative subconjunctival triamcinolone administration on glaucoma filtration. I. Trabeculectomy following subconjunctival triamcinolone. *Arch Ophthalmol*. 1986;104:838-41.
50. Tham CC, Li FC, Leung DY, Kwong YY, Yick DW, Chi CC, et al. Intra-bleb triamcinolone acetonide injection after bleb-forming filtration surgery (trabeculectomy, phacotrabeculectomy, and trabeculectomy revision by needling): a pilot study. *Eye*. 2006;20:1484-6.
51. Kahook MY, Camejo L, Noecker RJ. Trabeculectomy with intraoperative retrobulbar triamcinolone acetonide. *Clin Ophthalmol*. 2009;3:29-31.
52. Yuki K, Shiba D, Kimura I, Ohtake Y, Tsubota K. Trabeculectomy with or without intraoperative sub-tenon injection of triamcinolone acetonide in treating secondary glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2009;147:1055-60.
53. Alagöz N, Alagöz C, Yıldırım Y, Yeşilkaya C, Altan C, Bozkurt E, et al. The Effect of Adjuvant Intracameral Triamcinolone Acetonide on the Surgical Results of Trabeculectomy with Mitomycin C. *Turk J Ophthalmol*. 2016;46:169-74.
54. Li Z, Van Bergen T, Van de Veire S, Van de Vel I, Moreau H, Dewerchin M, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5217-25.

55. Sengupta S, Venkatesh R, Ravindran RD. Safety and efficacy of using off-label bevacizumab versus mitomycin C to prevent bleb failure in a single-site phacotrabeculectomy by a randomized controlled clinical trial. *J Glaucoma*. 2012;21:450-9.
56. Kaushik J, Parihar JK, Jain VK, Gupta S, Nath P, Durgapal P, *et al.* Efficacy of Bevacizumab Compared to Mitomycin C Modulated Trabeculectomy in Primary Open Angle Glaucoma: A One-Year Prospective Randomized Controlled Study. *Curr Eye Res*. 2017;42:217-24.
57. Kahook MY. Bleb morphology and vascularity after trabeculectomy with intravitreal ranibizumab: a pilot study. *Am J Ophthalmol*. 2010;150:399-403.
58. Suh W, Kee C. The Effect of Bevacizumab on the Outcome of Trabeculectomy with 5-Fluorouracil. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013;29:646-51.
59. Seet LF, Finger SN, Chu SW, Toh LZ, Wong TT. Novel insight into the inflammatory and cellular responses following experimental glaucoma surgery: a roadmap for inhibiting fibrosis. *Curr Mol Med*. 2013;13:911-28.
60. SooHoo J, Seibold L, Laing A, Kahook M. Bleb morphology and histology in a rabbit model of glaucoma filtration surgery using Ozurdex<sup>®</sup> or mitomycin-C. *Molecular Vision*. 2012;18:714-9.
61. Araujo SV, Spaeth GL, Roth SM, Starita RJ. A ten-year follow-up on a prospective, randomized trial of postoperative corticosteroids after trabeculectomy. *Ophthalmology*. 1995;102:1753-9.
62. Nguyen KD, Lee DA. Effect of steroids and nonsteroidal anti-inflammatory agents on human ocular fibroblast. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:2693-2701.
63. Van Bergen T, Vandewalle E, Moons L, Stalmans I. Complementary effects of bevacizumab and MMC in the improvement of surgical outcome after glaucoma filtration surgery. *Acta Ophthalmol*. 2015;93:667-78.
64. Miller MH, Grierson I, Unger WI, Hitchings RA. Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalmic Surg*. 1989;20:350-7.
65. Cheng G, Xianag H, Yang G, Ma J, Zhao J. Bevacizumab Inhibits Angiogenesis and Inflammation in Rat Filtration Surgery Model. *Cell Biochem Biophys*. 2015;73:71-7.

## APÊNDICES

### Apêndice A: Distribuição do peso pré-operatório dos coelhos no estudo.

Grupo 1	Peso	Grupo 2	Peso	Grupo 3	Peso
A1	2350g	B1	2080g	C1	2600g
A2	2670g	B2	2620g	C2	2410g
A3	2370g	B3	2700g	C3	2080g
A4	2355g	B4	2750g	C4	2800g
A5	2330g	B5	2600g	C5	2850g
A6	2110g	B6	2110g	C6	2150g
A7	2150g	B7	2050g	C7	2100g
A8	2050g	B8	2150g	C8	2225g
A9	2110g	B9	2200g	C9	2200g
A10	2100g	B10	2180g	C10	2320g
A11	2060g	B11	2200g	C11	2010g
A12	2250g	B12	2200g	C12	2200g
A13	2350g	B13	2350g	C13	2450g
A14	2070g	B14	2010g	C14	2010g
A15	2500g	B15	2100g	C15	2300g

### Apêndice B: Caracterização da área central da bolha ao longo do estudo.

Grupo	Fase					Comparação Fases (valor de p)
	1ºdia	3ºdia	7ºdia	14ºdia	30ºdia	
Controle	M=3,0±0,7 Md=3,0	M=2,8±0,4 Md=3,0	M=2,8±0,4 Md=3,0	M=2,0±0,0 Md=2,0	M=2,0±0,0 Md=2,0	<b>0,013</b>
MMC	M=3,2±0,8 Md=3,0	M=3,0±0,7 Md=3,0	M=3,2±0,4 Md=3,0	M=2,8±0,4 Md=3,0	M=2,8±0,4 Md=3,0	0,468
AT	M=3,0±0,0 Md=3,0	M=3,0±0,0 Md=3,0	M=3,0±0,0 Md=3,0	M=2,6±0,5 Md=3,0	M=2,0±0,0 Md=2,0	<b>0,003</b>
AT+MMC	M=2,8±0,4 Md=3,0	M=3,6±0,5 Md=4,0	M=3,4±0,5 Md=3,0	M=3,0±0,0 Md=3,0	M=2,8±0,4 Md=3,0	<b>0,017</b>
Bevacizumabe	M=2,6±0,5 Md=3,0	M=3,0±0,0 Md=3,0	M=3,0±0,0 Md=3,0	M=2,6±0,5 Md=3,0	M=2,6±0,5 Md=3,0	0,255
Bevacizumabe+MMC	M=3,2±0,4 Md=3,0	M=3,6±0,5 Md=4,0	M=3,2±0,4 Md=3,0	M=3,6±0,5 Md=4,0	M=3,4±0,5 Md=3,0	0,287

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

**Apêndice C: Caracterização da área máxima da bolha ao longo do estudo.**

Grupo	Fase					Comparação fases (valor de p)
	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=3,2 ± 0,8	M=3,2 ± 0,4	M=3,0 ± 0,0	M=2,8 ± 0,4	M=2,4 ± 0,5	<b>0,008</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	
MMC	M=3,6 ± 0,5	M=3,8 ± 0,4	M=3,6 ± 0,5	M=3,6 ± 0,5	M=3,0 ± 0,0	<b>0,003</b>
	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 3,0	
AT	M=3,8 ± 0,4	M=3,4 ± 0,5	M=3,0 ± 0,0	M=3,0 ± 0,0	M=3,0 ± 0,0	<b>0,002</b>
	Md = 4,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	
AT+MMC	M=3,6 ± 0,5	M=3,8 ± 0,4	M=3,8 ± 0,4	M=3,8 ± 0,4	M=3,0 ± 0,0	<b>0,005</b>
	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 3,0	
Bevacizumabe	M=3,2 ± 0,4	M=3,4 ± 0,5	M=3,0 ± 0,0	M=3,0 ± 0,0	M=3,0 ± 0,0	<b>0,003</b>
	Md = 3,0					
Bevacizumabe+MMC	M=3,8 ± 0,4	M=4,0 ± 0,0	M=4,0 ± 0,0	M=4,0 ± 0,0	M=3,8 ± 0,4	<b>0,001</b>
	Md = 4,0					

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

**Apêndice D: Caracterização da altura máxima da bolha ao longo do estudo.**

Grupo	Fase					Comparação fases (valor de p)
	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=3,0 ± 1,0	M=2,4 ± 0,5	M=2,0 ± 0,0	M=1,2 ± 0,4	M=1,0 ± 0,0	<b>0,002</b>
	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	Md = 1,0	Md = 1,0	
MMC	M=3,0 ± 0,7	M=3,2 ± 0,8	M=2,8 ± 0,4	M=2,0 ± 0,7	M=1,6 ± 0,5	<b>0,002</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	
AT	M=3,0 ± 0,7	M=2,4 ± 0,5	M=2,2 ± 0,4	M=1,8 ± 0,4	M=1,0 ± 0,0	<b>0,004</b>
	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	Md = 2,0	Md = 1,0	
AT+MMC	M=2,6 ± 0,5	M=3,6 ± 0,5	M=3,0 ± 0,7	M=2,6 ± 0,5	M=1,8 ± 0,4	<b>0,006</b>
	Md = 3,0	Md = 4,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	
Bevacizumabe	M=2,2 ± 0,4	M=2,2 ± 0,4	M=2,0 ± 0,0	M=2,0 ± 0,0	M=1,0 ± 0,0	<b>0,002</b>
	Md = 2,0	Md = 2,0	Md = 2,0	Md = 2,0	Md = 1,0	
Bevacizumabe+MMC	M=2,8 ± 0,4	M=3,0 ± 0,7	M=2,8 ± 0,8	M=2,6 ± 0,5	M=2,2 ± 0,4	0,228
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

**Apêndice E:** Caracterização da vascularização da área central da bolha ao longo do estudo.

Grupo	Fase					Comparação fases (valor de p)
	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=3,0 ± 0,7	M=4,0 ± 0,0	M=4,0 ± 0,0	M=3,8 ± 0,4	M=3,0 ± 0,0	<b>0,004</b>
	Md = 3,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 3,0	
MMC	M=2,8 ± 0,4	M=3,8 ± 0,8	M=3,2 ± 0,4	M=2,2 ± 0,4	M=2,6 ± 0,9	<b>0,008</b>
	Md = 3,0	Md = 4,0	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	
AT	M=3,0 ± 0,0	M=3,4 ± 0,5	M=3,8 ± 0,4	M=3,6 ± 0,5	M=2,8 ± 0,4	<b>0,027</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 3,0	
AT+MMC	M=3,0 ± 0,0	M=3,2 ± 0,4	M=2,8 ± 0,4	M=2,0 ± 0,7	M=2,4 ± 0,9	<b>0,028</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	
Bevacizumabe	M=3,4 ± 0,5	M=3,2 ± 0,8	M=3,4 ± 0,5	M=3,0 ± 0,0	M=2,4 ± 0,5	<b>0,117</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	
Becavizumabe+MMC	M=3,0 ± 0,0	M=2,8 ± 0,4	M=2,4 ± 0,5	M=2,2 ± 0,4	M=2,2 ± 0,4	<b>0,051</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	Md = 2,0	

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

**Apêndice F:** Caracterização da vascularização da área máxima da bolha ao longo do estudo.

Grupo	Fase					Comparação fases (valores de p)
	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=2,4 ± 0,5	M=3,0 ± 0,0	M=3,6 ± 0,5	M=3,4 ± 0,5	M=2,8 ± 0,4	<b>0,021</b>
	Md = 2,0	Md = 3,0	Md = 4,0	Md = 3,0	Md = 3,0	
MMC	M=2,2 ± 0,4	M=3,2 ± 0,4	M=3,2 ± 0,4	M=2,4 ± 0,9	M=2,4 ± 0,9	<b>0,002</b>
	Md = 2,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	
AT	M=2,8 ± 0,4	M=3,6 ± 0,5	M=3,6 ± 0,5	M=3,0 ± 0,0	M=2,8 ± 0,4	<b>0,033</b>
	Md = 3,0	Md = 4,0	Md = 4,0	Md = 3,0	Md = 3,0	
AT+MMC	M=3,0 ± 0,7	M=3,6 ± 0,5	M=2,8 ± 0,4	M=2,4 ± 0,5	M=2,2 ± 0,4	<b>0,016</b>
	Md = 3,0	Md = 4,0	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	
Becavizumabe	M=3,4 ± 0,5	M=3,0 ± 0,0	M=3,4 ± 0,5	M=2,6 ± 0,5	M=2,2 ± 0,4	<b>0,014</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	
Becavizumabe+MMC	M=3,0 ± 0,0	M=3,0 ± 0,0	M=2,8 ± 0,4	M=2,2 ± 0,4	M=2,0 ± 0,0	<b>0,003</b>
	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 3,0	Md = 2,0	Md = 2,0	

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

**Apêndice G:** Caracterização da vascularização da área que não pertence à bolha ao longo do estudo.

Grupo	Fase					Comparação fases (valor de p)
	1º dia	3º dia	7º dia	14º dia	30º dia	
Controle	M=1,2 ± 0,4 Md = 1,0	M=2,8 ± 0,4 Md = 3,0	M=2,8 ± 0,4 Md = 3,0	M=2,4 ± 0,5 Md = 2,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	<b>0,003</b>
MMC	M=1,8 ± 0,8 Md = 2,0	M=2,8 ± 0,4 Md = 3,0	M=2,2 ± 0,4 Md = 2,0	M=2,4 ± 0,5 Md = 2,0	M=2,2 ± 0,4 Md = 2,0	<b>0,156</b>
AT	M=2,4 ± 0,5 Md = 2,0	M=3,2 ± 0,4 Md = 3,0	M=2,8 ± 0,4 Md = 3,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	<b>0,005</b>
AT+MMC	M=3,0 ± 1,0 Md = 3,0	M=3,0 ± 0,0 Md = 3,0	M=2,8 ± 0,4 Md = 3,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	M=2,2 ± 0,4 Md = 2,0	<b>0,045</b>
Bevacizumabe	M=2,6 ± 0,5 Md = 3,0	M=2,4 ± 0,5 Md = 2,0	M=2,8 ± 0,4 Md = 3,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	<b>0,031</b>
Bevacizumabe+MMC	M=3,0 ± 0,7 Md = 3,0	M=2,6 ± 0,5 Md = 3,0	M=2,2 ± 0,4 Md = 2,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	M=2,0 ± 0,0 Md = 2,0	<b>0,024</b>

M= média ± desvio padrão  
Md= Mediana

Valor de p representa a avaliação de cada grupo no decorrer das fases do estudo.

## ANEXOS

---

### ANEXO A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 149 / 2012, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DE BOLSA FISTULANTE ANTIGLAUCOMATOSA EM OLHOS DE COELHOS USANDO BEVACIZUMAB, RANABIZUMAB E MITOMICINA C”, que tem como responsável Sebastião Cronemberger Sobrinho, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/07/2012. Este certificado se espira em 10/07/2017.

#### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 149 / 2012, related to the Project entitled “Evaluation of Antiglaucomatous Bleb in Rabbit Eyes after Using Bevacizumab, Ranabizumab and Mitomicin C”, under the supervision of Sebastião Cronemberger Sobrinho, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/07/2012. This certificate expires in 10/07/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 10/07/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

**ANEXO B**

Universidade Federal de Minas Gerais Comissão de Ética no Uso de Animais -  
CEUA

OF. CETEA-004/14 Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2014.

Sr. Prof. Sebastião Cronemberger Sobrinho, Departamento de Oftalmologia e Otorri-  
nolaringologia Faculdade, de Medicina Nesta

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG informa que na reunião  
ordinária do dia 17/02/2014, em face da solicitação apresentada por V. Sa., aprovou  
o pedido de adendo ao projeto de pesquisa protocolado sob o número 149/2012, título  
“Avaliação de bolsa fistulante antiglaucomatosa em olhos de coelhos usando Bevaciz-  
umab, Ranabizumab e Mitomicina C” para a substituição do fármaco Ranibizumabe  
para o Acetato de Triancinolona para agir no processo de cicatrização pós-cirurgia do  
glaucoma.

Considerando que a alteração do medicamento foi aprovada a modificação no título  
para Avaliação de bolsa fistulante antiglaucomatosa em olhos de coelhos usando Be-  
vacizumabe, Acetato de Triancinolona e Mitomicina C.

Sendo o que nos apresenta no momento, ficamos à sua inteira disposição para outros  
esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente

Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite Coordenadora da CEUA/UFMG

Assinatura manuscrita em tinta preta, correspondendo ao nome da coordenadora mencionada no texto anterior.

—

**ANEXO C**

Enviado em: 22 FEV 2017 15:06 EUA

De: arvoabstracts@arvo.org

Para: Enviemarangel@yahoo.com.br

Sujeito:

ARVO Resumo # 2687369 Notificação de agendamento

Quarta-feira, 22-Fev-2017

Cara Hayana Rangel,

Parabéns! O resumo em que você é o primeiro autor foi aceito e programado como uma apresentação do pôster para a reunião anual da ARVO 2017, 7-11, em Baltimore, Maryland.

Número da Apresentação - Pôster Número: 4952 - B0370

Nota: Você montará seu pôster em # B0370 no dia de apresentação atribuído indicado abaixo.

A modulação da cicatrização na cirurgia de glaucoma: um estudo experimental

Tipo de Apresentação: Pôster

Número da Sessão: 484

Título da sessão: Cirurgia e cicatrização de feridas

Data / Horário da Sessão: 10 de maio de 2017 das 15:45 às 17:30

Atenciosamente,

Craig E. Crosson, PhD, FARVO

Vice-Presidente Executivo e

Presidente, Comissão do Programa da Reunião Anual

**ANEXO D**