



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE MEDICINA**

**EVIAN VALLI DE AGUIAR**

**AÇÃO DE PROSTAGLANDINAS TÓPICAS  
NA CONJUNTIVA DE COELHOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Cirurgia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Chaves Jorge  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha

**Botucatu  
2019**

**EVIAN VALLI DE AGUIAR**

**AÇÃO DE PROSTAGLANDINAS TÓPICAS  
NA CONJUNTIVA DE COELHOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Cirurgia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Chaves Jorge  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Aguiar, Evian Valli de.

Ação de prostaglandinas tópicas na conjuntiva de coelhos / Evian Valli de Aguiar. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliane Chaves Jorge

Coorientador: Noeme Sousa Rocha

Capes: 40101177

1. Conjuntiva. 2. Coelho. 3. Inflamação. 4. Prostaglandinas. 5. Imunohistoquímica. 6. Metaloproteinase 2 da matriz.

Palavras-chave: Análogos de prostaglandinas; Coelhos; Conjuntiva; Imuno-histoquímica; Inflamação.

**Evian Valli de Aguiar**

Ação de Prostaglandinas Tópicas na Conjuntiva de Coelhos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Cirurgia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Chaves Jorge

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha

Comissão examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliane Chaves Jorge  
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço  
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

---

Prof. Dr. Mitsuo Hashimoto  
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço  
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

---

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho  
Universidade de Uberaba

Botucatu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

*Dedicatórias*

---

À minha orientadora, **Profa. Dra. Eliane Chaves Jorge**, por me aceitar nessa longa jornada, e pela paciência, orientação e compreensão.

Ao meu pai, **Wilson**, meu grande incentivador na busca pelo conhecimento.

À **minha família**, em especial meu irmão **Jorge**, meu incentivador e patrocinador.

# *Agradecimientos*

---

À **Profa. Dra. Maria Rosa Beth de Moraes**, que me recebeu e orientou nos primórdios dessa jornada.

À **Profa. Dra. Silvana Artioli Schellini**, por abrir as portas do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

À **Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, minha Co-orientadora. Por me estimular a buscar novos caminhos.

À **Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizon**, do Instituto de Biociências de Botucatu, pelo carinho e paciência durante a coleta de imagens histológicas e da imuno-histoquímica.

À família **Brescancini Fernandes**, pelo patrocínio, auxílio na logística, revisão de texto, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis dessa jornada.

À minha imensa família na FMB-UNESP, que muito contribuiu para o término deste ciclo, em especial:

**Nilse Ribeiro da Silva**, do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

**Marta Regina Russo Sarzi**, do antigo Departamento Experimental, atual Unipex; **Márcia Fonseca**, da Sessão de Pós-Graduação.

**José Carlos Pedroso de Lima**, do Departamento de Patologia e às funcionárias da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação, **Darcila de Fátima Bozoni**, **Marluci Betini**, **Nivaldete Costa Fernandes Cruz** e **Diva Aparecida Luvizuto Gasperini Rodrigues**, pelo tempo dispensado, ensinamentos técnicos sobre busca, redação e revisão bibliográfica.



*Resumo*

---

**AGUIAR EV.** Ação de prostaglandinas tópicas na conjuntiva de coelhos. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu. 2019.

**Introdução:** A utilização prolongada de colírios análogos de prostaglandinas (AP) no tratamento do glaucoma tem sido associada a alterações tóxicas e inflamatórias dos tecidos oculares. As causas destes efeitos adversos locais ainda não são bem conhecidas. Uma das hipóteses aventadas seria o efeito citotóxico dos conservantes dos colírios e outra o envolvimento das metaloproteinases, cuja expressão estaria relacionada às alterações estruturais induzidas pelo uso crônico dos AP. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a conjuntiva de coelhos submetidos à tratamento ocular tópico com AP e solução conservante por meio de estudo histológico, morfométrico e imuno-histoquímico. **Material e Métodos:** Quarenta coelhos adultos saudáveis da raça Norfolk, de ambos os sexos, com peso entre 1500 e 2500g, foram divididos por sorteio em quatro grupos experimentais. Os olhos direitos dos animais foram tratados com uma gota diária de bimatoprost 0,03%, travoprost 0,004%, latanoprost 0,005%, e solução conservante por 30 dias (20 animais) e 60 dias (20 animais). Todos os coelhos foram submetidos à avaliação clínica oftalmológica com documentação fotográfica. Após a eutanásia, os olhos foram enucleados e preparados para análise histológica, morfométrica e imuno-histoquímica com pesquisa de expressão de metaloproteinase 2 (MMP2). **Resultados:** Houve aumento de espessura epitelial e estromal em todos os grupos tratados, principalmente no grupo latanoprost com 30 dias e bimatoprost com 60 dias ( $p < 0,001$ ). A análise histológica com 30 dias revelou infiltração linfocitária, degeneração vacuolar, perda da relação núcleo citoplasma, corpos apoptóticos, diminuição das células caliciformes, principalmente nos grupos bimatoprost e travoprost. Com 60 dias houve intensa desorganização tecidual em todos os grupos tratados, com metaplasia escamosa no grupo latanoprost. No grupo conservante as alterações morfológicas foram leves com 30 dias e se intensificaram com 60 dias, apresentando hiperplasia do epitélio e anaplasia. A expressão da MMP2 foi mais pronunciada nos grupos tratados com AP nos primeiros 30 dias. **Conclusão:** Todas as medicações testadas, inclusive a solução conservante, causaram algum grau de inflamação e deterioração tecidual na conjuntiva depois de 30 ou 60 dias de tratamento. Houve expressão da MMP2, mais acentuada na fase aguda do experimento.

**Palavras-chave:** conjuntiva; coelhos; inflamação; análogos de prostaglandinas; metaloproteinase 2; imuno-histoquímica.

*Abstract*

---

AGUIAR EV. Action of topical prostaglandins in conjunctiva of rabbits. Dissertation (Master degree) – Medicine School of Botucatu, UNESP, Botucatu. 2018.

**Introduction:** Prolonged use of prostaglandin (PA) analog drops in the treatment of glaucoma has been associated with toxic and inflammatory changes in ocular tissues. The causes of these local adverse effects are not yet well known. One of the hypotheses proposed would be the cytotoxic effect of the preservatives of the eye drops and another the involvement of the metalloproteinases, whose expression would be related to the structural alterations induced by the chronic use of PA. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the conjunctiva of rabbits submitted to topical ocular treatment with PA and preservative solution by histological, morphometric and immunohistochemical study. **Material and Methods:** Forty healthy adult Norfolk rabbits, weighing between 1500 and 2500g, were divided by lot into four experimental groups. The right eyes of animals were treated with a daily drop of 0.03% bimatoprost, 0.04% travoprost, 0.005% latanoprost, and placebo preservative solution for 30 days (20 animals) and 60 days (20 animals). All rabbits were submitted to clinical ophthalmological evaluation with photographic documentation. After euthanasia, the eyes were enucleated and prepared for histological, morphometric and immunohistochemical analysis with metalloproteinase 2 (MMP2) expression research. **Results:** There was an increase in epithelial and stromal thickness in all treated groups, mainly in the 30 day latanoprost group and 60 day bimatoprost group ( $p < 0.001$ ). Histological analysis with 30 days revealed lymphocytic infiltration, vacuolar degeneration, loss of nucleus cytoplasm, apoptotic bodies, decrease of goblet cells, especially in the bimatoprost and travaprost groups. At 60 days there was intense tissue disorganization in all treated groups, with squamous metaplasia in the latanoprost group. In the preservative group, the morphological changes were mild at 30 days and intensified at 60 days, presenting epithelial hyperplasia and anaplasia. The expression of MMP2 was more pronounced in PA treated group in the first 30 days. **Conclusion:** All medications tested, including the preservative solution, caused some degree of inflammation and tissue deterioration in the conjunctiva after 30 or 60 days of treatment. There was MMP2 expression, more pronounced in the acute phase of the experiment.

**Keywords:** conjunctiva; rabbits; inflammation; prostaglandin analogs; metalloproteinase 2; immunohistochemistry.

# *Lista de Figuras*

---

Figura 1 - Estrutura química da qual derivam os análogos da prostaglandina .....	26
Figura 2 - Estrutura química da Latonoprosta .....	27
Figura 3 - Estrutura química da Travoprosta .....	27
Figura 4 - Estrutura química da bimatoprosta .....	28
Figura 5 - Estrutura química da tafluprosta .....	29
Figura 6 - Esquema ilustrando as duas vias de drenagem do humor aquoso (convencional e úveo-escleral), bem como a relação entre as estruturas oculares próximas .....	30
Figura 7 - Fotomicrografia mostrando a conjuntiva palpebral (seta única), bulbar (dupla) e o fórnice (tripla) .....	31
Figura 8 - Fotomicrografia da conjuntiva, evidenciando células caliciformes, camada epitelial, estroma subjacente, linfócitos e capilar .....	32
Figura 9 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival zero em avaliação com 30 dias .....	44
Figura 10 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 1+ em avaliação com 30 dias .....	44
Figura 11 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 2+ em avaliação com 30 dias .....	44
Figura 12 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 3+ em avaliação com 30 dias .....	45
Figura 13 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival zero em avaliação com 60 dias .....	45
Figura 14 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 1+ em avaliação com 60 dias .....	45
Figura 15 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 2+ em avaliação com 60 dias .....	46

Figura 16 - Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 4+ em avaliação com 30 dias .....	46
Figura 17 - Fotomicrografias de amostras de epitélio conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M30.....	55
Figura 18 - Fotomicrografias de amostras de epitélio conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M60.....	56
Figura 19 - Fotomicrografias de amostras de epitélio conjuntival dos olhos esquerdos não tratados .....	57
Figura 20 - Fotomicrografias de amostras de estroma conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M30.....	59
Figura 21 - Fotomicrografias de amostras de estroma conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M60.....	60
Figura 22 - Fotomicrografias de amostras de fibras do tecido estromal dos olhos esquerdos (não tratados).....	61
Figura 23 - Conjuntiva dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M30, apresentando marcação pela metaloproteinase 2 (MMP2).....	62
Figura 24 - Conjuntiva dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M60, apresentando marcação pela metaloproteinase 2 .....	63
Figura 25 - Fotomicrografias de amostras de conjuntiva de olhos esquerdos não tratados mostrando a não expressão da MMP2 .....	64

# *Lista de Tabelas*

---



Tabela 1 - Hiperemia conjuntival dos 40 animais com 30 dias .....	52
Tabela 2 - Hiperemia conjuntival dos 20 animais com 60 dias .....	52
Tabela 3 - Pressão intraocular média dos olhos dos coelhos tratados com análogos de prostaglandina e solução conservante placebo aos 30 e 60 dias	53
Tabela 4 - Espessura epitelial média ( $\mu\text{m}$ ) da conjuntiva de coelhos, após 30 e 60 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e solução conservante placebo	53
Tabela 5 - Espessura epitelial média ( $\mu\text{m}$ ) da conjuntiva de olhos esquerdos, não tratados	54
Tabela 6 - Espessura estromal média ( $\mu\text{m}$ ) do estroma de coelhos, após 30 e 60 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e solução conservante placebo	58
Tabela 7 - Espessura estromal média ( $\mu\text{m}$ ) da conjuntiva de olhos esquerdos de coelhos, não tratados	59
Tabela 8 - Expressão da MMP2 na conjuntiva dos coelhos tratados com 30 e 60 dias	61

*Lista de Abreviaturas  
e Símbolos*

---

AP	análogos de prostaglandinas
APMA- P	<i>aminophenil mercuric acetate</i>
CA	Califórnia
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAB	<i>diaminobenzidine</i>
DAKO	<i>Branche of entreprise Agilent</i>
DP	Desvio padrão
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
HE	Hematoxilina e Eosina
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen, DR type</i>
IAC	Inibidores de anidrase carbônica
Ig G1	<i>Antiboby anti Ig G</i>
IL	<i>interleukin</i>
MMP	metaloproteinase
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
PBS	<i>Phosfate-bufferid saline</i>
PG	<i>Prostaglandin</i>
PIO	Pressão intraocular
SAS	<i>Statistical analysis software</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis alfa fator</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UK	<i>United Kingdom</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>

# *Sumário*

---

---

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1 Tratamento medicamentoso do glaucoma .....	22
1.1.1 Agentes colinérgicos .....	23
1.1.2 Agentes agonistas adrenérgicos .....	24
1.1.3 Inibidores da anidrase carbônica .....	24
1.1.4 Betabloqueadores .....	25
1.1.5 Análogos de prostaglandinas .....	25
1.1.5.1 Latanoprostá .....	27
1.1.5.2 Travoprostá .....	27
1.1.5.3 Bimatoprostá .....	28
1.1.5.4 Tafluprostá .....	28
1.1.5.5 Mecanismo de ação dos Análogos de prostaglandinas .....	29
1.1.5.6 Efeitos colaterais dos Análogos de prostaglandinas .....	30
1.2 Efeitos dos Análogos de prostaglandinas sobre a superfície ocular .....	31
1.2.1 Conjuntiva humana e de Coelhos .....	31
1.2.2 Uso crônico dos Análogos de prostaglandinas .....	32
1.3 Metaloproteinases .....	33
1.4 Justificativa do estudo .....	35
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
2.1 Objetivo .....	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
3.1 Animais utilizados .....	39
3.2 Grupos experimentais .....	39
3.3 Momentos Experimentais .....	40
3.4 Atributos Estudado .....	40
3.4.1 Avaliação Clínica .....	40
3.4.2 Avaliação Histo-morfométrica .....	40
3.4.3 Imuno-histoquímica .....	41
3.5 Sequência das Etapas Experimentais .....	41
3.6 Técnicas Utilizadas .....	42
3.6.1 Administração dos colírios .....	42
3.6.2 Anestesia .....	42

---

3.6.3 Exame oftalmológico .....	43
3.6.3.1 Avaliação da hiperemia conjuntival .....	43
3.6.3.2 Tonometria de aplanção .....	44
3.6.4 Documentação Fotográfica .....	47
3.6.5 Eutanásia .....	47
3.6.6 Enucleação .....	47
3.6.7 Preparo da conjuntiva para exame histopatológico .....	47
3.6.7.1 Técnica para Hematoxilina e eosina .....	48
3.6.7.2 Técnica para Imuno-histoquímica .....	48
3.7 Análise estatística .....	50
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
4.1 Avaliação Clínica .....	52
4.1.1 Mensuração da hiperemia conjuntival .....	52
4.1.2 Mensuração da Pressão intraocular .....	52
4.2 Avaliação Histo-morfométrica .....	53
4.3 Avaliação Imuno-histoquímica .....	61
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
5.1 Avaliação clínica .....	66
5.2 Avaliação Histo-morfométrica .....	68
5.3 Avaliação Imuno-histoquímica .....	71
5.4 Considerações finais .....	73
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>94</b>

# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

O glaucoma é uma neuropatia óptica progressiva de etiologia multifatorial que resulta em morte das células ganglionares da retina, dano ao nervo óptico e defeitos de campo visual<sup>1,2</sup>. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são muito importantes, pois a perda de visão é permanente<sup>3</sup>.

A doença é a principal causa de cegueira irreversível no mundo, sendo que aproximadamente 79,6 milhões de pessoas serão afetadas por ela até o ano 2020 e 10% delas desenvolverão cegueira bilateral<sup>2,4</sup>.

Dados epidemiológicos de uma metanálise de 2014, revelaram que o número de pessoas com glaucoma em todo o mundo aumentará para 111,8 milhões em 2040, afetando principalmente pessoas residentes na Ásia e na África<sup>5</sup>.

No Brasil, estudo feito em 2009 demonstrou que 900 mil pessoas com idade acima de 40 anos tinham glaucoma no país e que somente 20% destes casos haviam sido detectados em campanhas populacionais de prevenção à doença<sup>6</sup>.

Diversos são os fatores de risco para o glaucoma, como o aumento da pressão intraocular (PIO), idade avançada, raça negra, histórico familiar, pouca espessura central da córnea e aumento da relação escavação/disco óptico. O aumento da PIO tem importante papel no desenvolvimento e progressão da doença e é o único fator de risco que pode ser alterado pela terapia antiglaucomatosa<sup>7</sup>. O controle adequado da PIO reduz os danos ao nervo óptico e previne a instalação da cegueira<sup>8-10</sup>.

### 1.1 Tratamento medicamentoso do glaucoma

Existem duas modalidades principais de tratamento para o glaucoma, o medicamentoso e o cirúrgico. O tratamento ideal, que ainda não existe, seria aquele capaz de causar a cura definitiva da doença, com baixo custo, fácil posologia e sem efeitos colaterais<sup>8</sup>.

A terapia com drogas tópicas hipotensoras é o mais utilizado na prática clínica<sup>11-14</sup> e a escolha da melhor opção é feita de acordo com o mecanismo de ação da droga, eficácia na diminuição da PIO, possíveis efeitos colaterais e custo<sup>8</sup>.

Os agentes hipotensores são divididos em vários grupos conforme a estrutura química e ação farmacológica. Os grupos mais utilizados são os agentes



---

colinérgicos, betabloqueadores adrenérgicos, alfa 2 agonistas adrenérgicos, inibidores de anidrase carbônica e análogos de prostaglandinas<sup>14-16</sup>.

### 1.1.1 Agentes colinérgicos

Os agentes autonômicos que atuam no sistema colinérgico utilizam como mediador fisiológico a acetilcolina, e produzem miose por contração da pupila e do músculo ciliar. Estes fármacos são denominados agonistas colinérgicos ou parassimpatomiméticos e agem promovendo o aumento do escoamento do humor aquoso pela via trabecular<sup>17</sup>.

O estímulo sobre os receptores colinérgicos pode ser direto, por mimetismo da ação da acetilcolina (caso da pilocarpina), ou indireto, pela interrupção da degradação sináptica da acetilcolina pelas colinesterases<sup>18</sup>.

Estas drogas apresentam diversos efeitos colaterais locais como embaçamento visual, espasmo do corpo ciliar e comprometimento do efeito de acomodação, formação de cistos irianos, uveíte anterior, irritação conjuntival, catarata e descolamento de retina. Os efeitos sistêmicos são cefaléia, náusea, vômitos, dor abdominal, diarreia, broncoespasmo, bradicardia, sudorese, salivação, ansiedade, tremores e câimbras musculares<sup>18-21</sup>.

A primeira droga com ação anti-colinesterase utilizada como hipotensor ocular foi a fisostigmina, extraída do feijão Calabar, cuja ação provoca miose intensa em 30 minutos, que se mantém por 24 a 72 horas. Seu uso foi descontinuado nos dias atuais, pelo alto potencial de efeitos adversos<sup>20</sup>.

A pilocarpina, a segunda droga de ação colinérgica descrita na literatura como redutora da pressão intraocular, foi durante muito tempo a mais utilizada no tratamento clínico do glaucoma, mas perdeu espaço por possuir meia-vida curta, exigir muitas instilações diárias e apresentar efeitos colaterais frequentes. Sua ação hipotensora se dá graças ao aumento da drenagem do humor aquoso, por sua via convencional, além de diminuir sua produção<sup>22</sup>. O carbachol, é outro agente colinérgico, de longa duração, que devido à sua estrutura de amina quaternária e baixa absorção sistêmica provoca poucos efeitos colaterais. Atualmente não é mais utilizado no tratamento clínico do glaucoma, estando disponível apenas para uso intra-cameral no final da cirurgia de catarata<sup>23</sup>.

### 1.1.2 Agentes agonistas adrenérgicos

Os fármacos desse grupo produzem midríase pela contração do músculo dilatador da íris e agem reduzindo a produção do humor aquoso ou aumentando a sua drenagem<sup>24</sup>.

A epinefrina é um hormônio natural, agonista adrenérgico não seletivo. É considerada a primeira droga coadjuvante para tratamento do glaucoma, e os primeiros relatos da sua utilização como agente redutor da pressão ocular datam do início do século vinte. Seu uso foi abandonado pela intensidade dos efeitos colaterais locais e sistêmicos<sup>25</sup>.

A brimonidina e a apraclonidina são drogas mais recentes e apresentam mecanismos hipotensores diferentes. Ambas reduzem a produção do humor aquoso, porém a brimonidina aumenta também a drenagem por via úveo-escleral. O Tartarato de brimonidina a 0,2% e 0,15%, é o único agonista alfa-adrenérgico disponível no Brasil. Ele é um agonista altamente seletivo do receptor alfa 2 e também está disponível no mercado farmacológico em associação com o Maleato de timolol a 0,5%<sup>26</sup>.

Os agonistas adrenérgicos podem reduzir a PIO em torno de 20%. Os efeitos colaterais locais incluem, conjuntivites alérgicas, hiperemia conjuntival, ardência, coceira, dor e edema macular cistóide em olhos afácicos. Problemas cardíacos como arritmia, aumento da pressão arterial, e depressão do sistema nervoso central em crianças, são efeitos sistêmicos possíveis<sup>27-31</sup>.

### 1.1.3 Inibidores da anidrase carbônica

Os inibidores da anidrase carbônica (IAC) pertencem ao grupo das sulfonamidas e surgiram no final da década de 30 como drogas antibióticas e diuréticas. Friedenwald, em 1949, postulou a hipótese de que os IAC teriam efeito redutor da pressão intraocular, porém somente nos anos 50, a acetazolamida começou a ser utilizada por via oral, no tratamento de pacientes com glaucoma, após a constatação de seu poder hipotensor e não toxicidade<sup>30,31</sup>.

Nos anos seguintes, novos inibidores de anidrase carbônica surgiram (diclorfenamida, etoxzolamida e metazolamida), porém foram abandonados por causarem efeitos colaterais sistêmicos importantes<sup>32</sup>.

Uma droga mais recente deste grupo, a dorzolamida, possui potente

efeito hipotensor por inibir duas das sete isoenzimas da anidrase carbônica, diminuindo a formação do bicarbonato de sódio e reduzindo a secreção do humor aquoso em até 50%, com poucos efeitos colaterais sistêmicos<sup>33</sup>.

Os principais efeitos colaterais locais dos IAC tópicos são: reações alérgicas na superfície ocular, desconforto ocular e ardência. Os efeitos colaterais sistêmicos incluem parestesia, distúrbios gastrointestinais, urolitíase anorexia, letargia e depressão. São contraindicados em pacientes hipertensos, renais crônicos e sensíveis a sulfonamidas<sup>29,32-33</sup>.

#### 1.1.4 Betabloqueadores

Existem dois tipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos, o  $\beta_1$  e o  $\beta_2$ . Os receptores  $\beta_1$  aumentam a contratilidade cardíaca e a lipólise, e os  $\beta_2$ , a broncodilatação e vasodilatação. A inibição dos receptores  $\beta$  diminui a PIO em 30 a 50%, por redução da produção do humor aquoso. As drogas desta classe são denominadas simpatolíticas, antagonistas  $\beta$  adrenérgicas ou  $\beta$  bloqueadoras<sup>32</sup>.

O propranolol foi o primeiro betabloqueador utilizado como hipotensor ocular. De ação rápida e eficaz quando administrado por via oral, teve seu uso descontinuado pelos efeitos indesejados sobre a superfície ocular (diminuição da sensibilidade corneana e xeroftalmia)<sup>34</sup>.

O  $\beta$  bloqueador mais utilizado na clínica é o maleato de timolol 0,5%, que é não seletivo. Outros exemplos desta classe são o levobutanolol, metipranolol, carteolol e o betaxolol, único  $\beta_1$  seletivo. Os efeitos adversos sistêmicos destas drogas são inúmeros, e atingem principalmente o sistema cardiorrespiratório e o sistema nervoso central. Depressão, intolerância ao exercício, zumbido, falha de memória e confusão mental, impotência sexual e alterações glicêmicas também são efeitos colaterais descritos em usuários de  $\beta$  bloqueadores<sup>35</sup>.

#### 1.1.5 Análogos de prostaglandinas (AP)

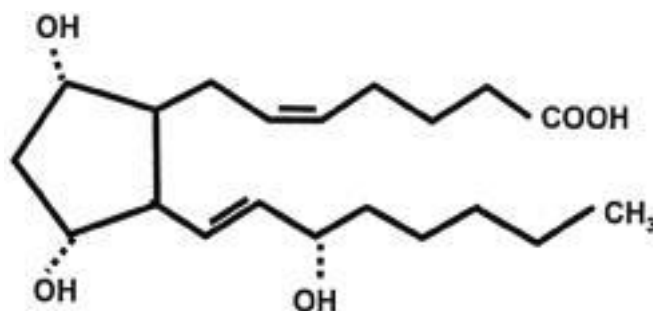
As prostaglandinas são moléculas pró-inflamatórias derivadas do metabolismo do ácido araquidônico, degradadas pelas enzimas ciclo-oxigenases 1 e 2. Existem cinco classes de prostaglandinas, PGE 2, PGF 2, PGI 2, PGD 2 e tromboxano A e cada prostaglandina produz diferentes respostas moduladas pela interação com seus receptores acoplados à proteína G. A PGE possui quatro

receptores (EP1 a EP4), enquanto a PGD apenas dois (DP1 e DP2). As demais prostaglandinas (PGI, PGF e TXA) possuem apenas um receptor, IP, FP e TP, respectivamente<sup>36</sup>. A diversidade de receptores possibilita que as prostaglandinas desempenhem diferentes papéis biológicos importantes, dentre eles, a redução da pressão intraocular. Nos tecidos oculares existem os receptores FP e os EP1 a 4, localizados nos tecidos úveo-esclerais, corpo ciliar, esclera, córnea, conjuntiva, malha trabecular, vasos capilares e sistema venoso das vias de drenagens<sup>36-37</sup>.

A busca por novas moléculas com potência hipotensora e comodidade posológica, que pudessem impedir os efeitos devastadores do glaucoma, incentivou o desenvolvimento de novas medicações tópicas, dentre elas, as prostaglandinas sintéticas, também conhecidas como análogos de prostaglandinas. O poder hipotensor ocular dessa classe de colírios, reduz a PIO basal em até 40%, o que possibilita a monoterapia no tratamento do glaucoma, com uma instilação ao dia<sup>38</sup>.

Prostaglandinas, prostaminas e docosanóides fazem parte deste novo grupo de agentes farmacológicos, que embora estruturalmente diferentes, compartilham características similares, como o mecanismo de ação. Todos os análogos da PG derivam de um núcleo de 21 carbonos, com um anel pentila provido de dois importantes grupos hidroxila, uma cadeia alfa superior e uma cadeia ômega inferior<sup>39</sup> (Figura 1).

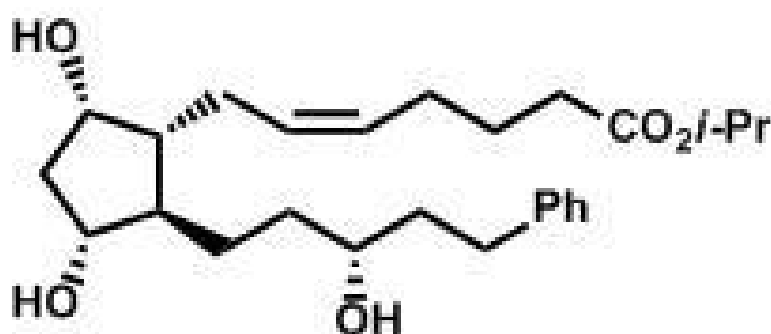
Atualmente há quatro tipos de análogos de prostaglandinas aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponíveis no mercado brasileiro: latanoprost 0,005%, bimatoprost 0,03% e 0,01%, travoprost 0,004% e tafluprost 0,0015%<sup>20</sup>. A latanoprost 0,005% foi a primeira droga a ser comercializada no Brasil<sup>40</sup>.



**Figura 1.** Estrutura química da qual derivam os análogos da prostaglandina.  
Fonte: Ritter et al. 2016<sup>41</sup>.

### 1.1.5.1 Latanoprost 0,005%

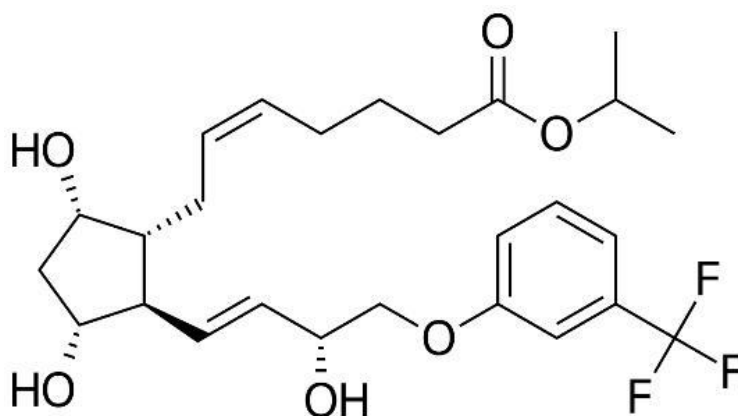
A latanoprost 0,005% é um análogo da  $PGF_{2\alpha}$  que atua como agonista seletiva do receptor prostanoide FP. Sua estrutura química ( $C_{26}H_{40}O_5$ ) foi modificada para facilitar a penetração pela córnea, aumentar a afinidade pelo receptor FP e diminuir a hiperemia conjuntival (Figura 2). A solução de latanoprost 0,005% foi aprovada pela ANVISA e lançada no mercado brasileiro em 1997. Administrada uma vez ao dia, reduz em 20 a 35% a PIO e quando comparada aos outros análogos, seu efeito hipotensor é menor, porém a eficácia é semelhante<sup>42-45</sup>.



**Figura 2.** Estrutura química da Latanoprost. Fonte: Patel, 1996<sup>45</sup>.

### 1.1.5.2 Travoprost 0,004%

A travoprost é um análogo da  $PGF_{2\alpha}$ . Sua estrutura química,  $C_{26}H_{35}F_3O_6$ , também foi modificada (Figura 3) e o seu mecanismo de ação, absorção e efeito hipotensor é semelhante aos da latanoprost 0,005%. Quando em uso combinado com outras drogas, seu potencial hipotensor aumenta<sup>46</sup>.

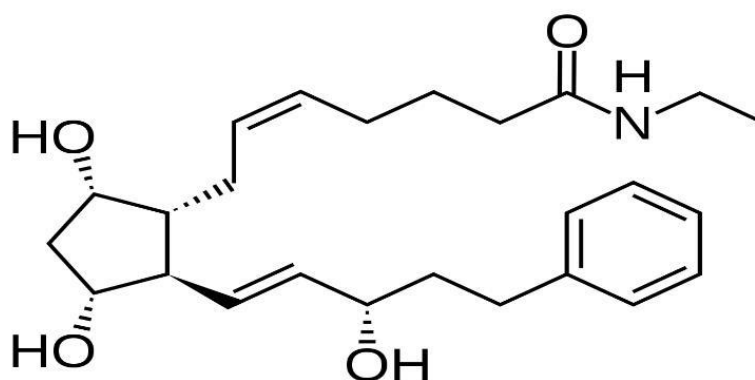


**Figura 3.** Estrutura química da Travoprost. Fonte: Boulton 2002<sup>47</sup>.

### 1.1.5.3. Bimatoprosta 0,03%

A bimatoprosta 0,03% foi lançada no mercado em 2001 e é uma prostamida, apesar de apresentar estrutura química (C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub>) semelhante à dos análogos da prostaglandina (Figura 4). É encontrada naturalmente nos tecidos e a presença do grupo etilamida na posição C1 em sua molécula, a torna dependente da hidrólise corneana para que a sua forma ácida tenha efetivamente a atividade agonista ao receptor FP<sup>43</sup>.

Seu poder hipotensor varia de 30 a 40%. Estudos comparativos mostraram, no tocante à redução da PIO, uma maior eficácia da bimatoprosta 0,03% em relação ao maleato de timolol 0,5%, mesmo quando em associação a outras classes de hipotensores oculares. Quando se comparam a outros análogos de prostaglandina, estudos evidenciam também maior redução da PIO<sup>42,48-49</sup>.



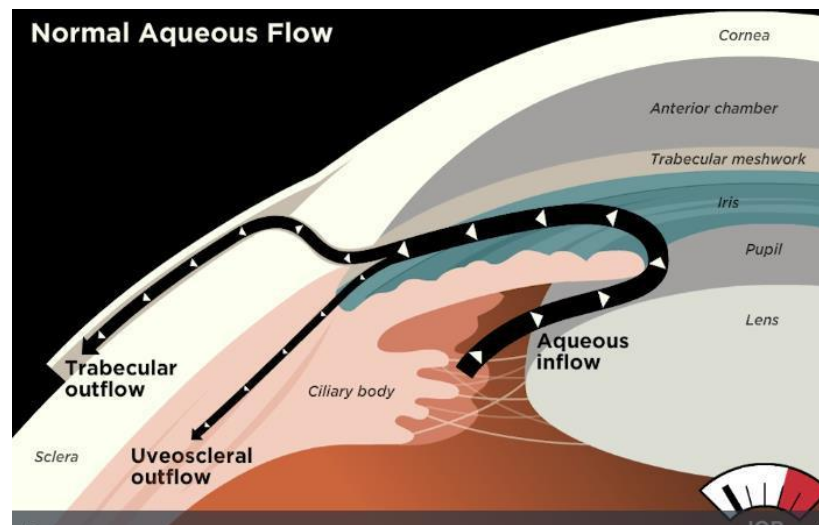
**Figura 4.** Estrutura química da bimatoprosta 0,03%.

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?term=bimatoprost><sup>50</sup>.

### 1.1.5.4 Tafluprosta 0,0015%

A última droga desse grupo é a tafluprosta 0,0015%, um prostanóide FP agonista sintético, sem conservantes (Figura 5). Assim como a bimatoprosta 0,03%, metabolizada pelas esterases corneanas à um ácido, o ativo resultante age como agonista no receptor prostanoide FP, promovendo redução da PIO através do aumento do fluxo úveo-escleral<sup>51</sup>. Estudos prévios observaram que o metabólito da tafluprosta 0,0015% é o que tem a maior afinidade pelo receptor FP, dentre os derivados de prostaglandina atualmente disponíveis<sup>51</sup> sendo esta afinidade 12 vezes maior que a do metabólito da latanoprost, porém seu efeito hipotensor dose dependente é semelhante<sup>52,53</sup>.





**Figura 6.** Esquema ilustrando as duas vias de drenagem do humor aquoso (convencional e úveo-escleral), bem como a relação entre as estruturas oculares próximas. Fonte: <https://www.aaopt.org/basic-skills/animation-of-aqueous-flow><sup>58</sup>.

#### 1.1.5.6 Efeitos colaterais dos análogos de prostaglandinas

Os análogos de prostaglandinas podem causar efeitos adversos sistêmicos leves a moderados, como náuseas, dor abdominal, fadiga, tontura, sudorese, ansiedade, cefaleia, e mais raramente angina, taquicardia e hipertensão arterial<sup>63</sup>.

Localmente, estas drogas podem alterar a cor da íris, aumentando a quantidade de pigmento castanho, particularmente em pacientes com íris de cor mista<sup>64</sup>. Essa alteração é causada pelo aumento do conteúdo de melanina do estroma da íris, e não regride com a interrupção do tratamento. Pode ocorrer ainda hiperpigmentação da pele periorcular e aumento da espessura e do comprimento dos cílios (hipertricose)<sup>63</sup>.

Entre os efeitos colaterais mais importantes estão a quebra da barreira hemato-aquosa e o edema macular cistóide<sup>64-66</sup>. Estudos relacionaram casos de uveíte anterior e edema macular em pacientes pseudofácicos e afácicos, usuários de latanoprost<sup>66,67</sup>. Existem também descrições de edema macular cistóide documentado por meio de angiofluoresceínografia em pacientes com glaucoma submetidos à cirurgia de catarata que haviam iniciado terapia medicamentosa com bimatoprost, travoprost e unoproston<sup>65</sup>.

Outros efeitos colaterais associados ao uso dos análogos da PG são relacionados a alterações da superfície ocular e a periorbitopatia que inclui atrofia da



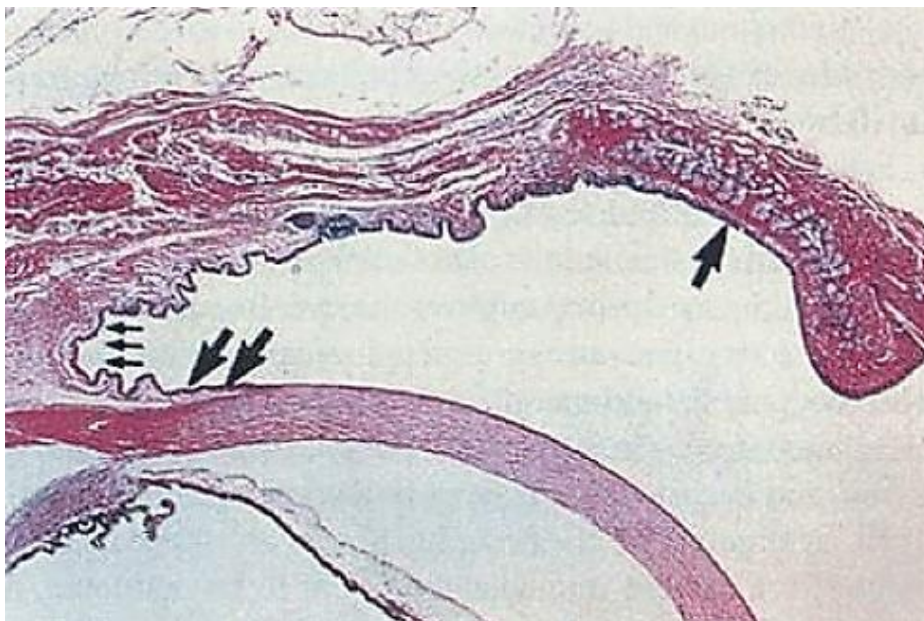
gordura periorbitária, aprofundamento do sulco da pálpebra superior, ptose, enoftalmia e involução da dermatocálase<sup>68</sup>.

## 1.2 Efeitos dos análogos de prostaglandinas sobre a superfície ocular

### 1.2.1 Conjuntiva humana e de coelho

A conjuntiva humana é uma membrana mucosa, transparente e fina formada por duas porções: a bulbar, em contato com o bulbo e fracamente aderida à cápsula de Tenon, e a palpebral, que reveste internamente as pálpebras e está firmemente aderida ao tarso. O local de junção e reflexão das duas partes é chamado de fundo de saco ou fórnice<sup>69,70</sup>. É ricamente vascularizada, e formada por tecido conectivo e linfoide (Figura 7)<sup>71</sup>.

A conjuntiva apresenta duas camadas, uma superficial epitelial e outra mais profunda, estromal. Na epitelial há células secretoras e não secretoras. As secretoras, também conhecidas como caliciformes, correspondem a 10% do total de células conjuntivais. No estroma há fibroblastos, macrófagos, mastócitos, polimorfonucleares, eosinófilos e linfócitos, células caliciformes e glândulas lacrimais acessórias<sup>72</sup>.

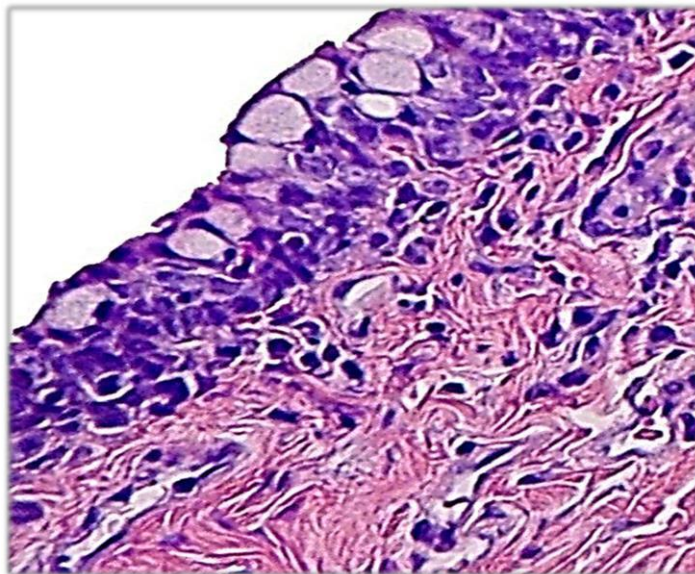


**Figura 7.** Fotomicrografia mostrando a conjuntiva palpebral (seta única), bulbar (dupla) e o fórnice (tripla). H & E 2x5. Fonte: Sternberg, 1997<sup>71</sup>.

Nos coelhos, a conjuntiva também é dividida em palpebral, bulbar, e fórnice, porém ventralmente se reflete sobre a membrana nictante ou terceira pálpebra, formando o saco conjuntival. A coloração é avermelhada e brilhante nas margens palpebrais e mais amarela no bulbo ocular. Os coelhos albinos não apresentam coloração conjuntival<sup>73,74</sup>.

Microscopicamente, a conjuntiva dos coelhos é formada por epitélio e estroma, que é mais fibroso. O epitélio muda estruturalmente a medida que sofre transição anatômica, do tipo estratificado escamoso a colunar, na região palpebral, para estratificado cilíndrico, no fórnice. Próximo das margens palpebrais há células globosas, cuja densidade aumenta no fórnice<sup>74</sup>.

O estroma é um tecido conjuntivo fibrovascular que possui grande variedade de células e tecidos, como glândulas lacrimais acessórias e folículos linfáticos com centros germinativos, principalmente nos fórnices. Possui em abundância linfócitos-B e T, os quais desempenham um importante papel na resposta imunológica da conjuntiva<sup>75,76</sup> (Figura 8).



**Figura 8.** Fotomicrografia da conjuntiva de coelho, evidenciando células caliciformes, camada epitelial, estroma subjacente, linfócitos e capilar. 400x. Fonte: Lima, 2014<sup>76</sup>.

### 1.2.2 Uso crônico dos análogos de prostaglandinas

A terapia medicamentosa do glaucoma é crônica, e frequentemente a associação de drogas é necessária para evitar a perda de visão permanente, o que aumenta o custo do tratamento e o risco de aparecimento de efeitos colaterais

indesejáveis, decorrente do uso prolongado dos colírios. Algumas características dos análogos de prostaglandinas, como a posologia confortável e a eficácia clínica como monoterapia, tem estimulado o uso cada vez maior desta classe de fármacos<sup>77,78</sup>.

No entanto, a exposição prolongada da superfície ocular aos AP tem sido associada a alterações tóxicas e inflamatórias, especialmente da conjuntiva e córnea, causando desestabilização do filme lacrimal e desconforto após o uso, com prejuízo à aderência ao tratamento.<sup>79,80</sup> A idade avançada de grande parte dos pacientes submetidos ao tratamento de glaucoma aumenta a probabilidade da pré-existência de doenças da superfície ocular e de olho seco, agravando as alterações clínicas, após a introdução dos análogos de prostaglandinas<sup>81</sup>.

A hiperemia conjuntival, efeito colateral mais frequente, atinge cerca de 50% dos usuários dos análogos de prostaglandinas. Postula-se que a causa seja o processo inflamatório induzido pelo efeito vasodilatador das drogas ou pela ação dos conservantes, adicionados aos colírios pelo efeito antimicrobiano e papel na absorção dos fármacos<sup>82-84</sup>.

Estudos clínicos e experimentais correlacionam a concentração do conservante cloreto de benzalcônio, amplamente utilizado, com a diminuição da estabilidade do filme lacrimal, agravamento dos sintomas de olho seco, infiltração de células inflamatórias na conjuntiva, ceratite punctata superficial, blefarite, e eczema palpebral<sup>85</sup>. O remodelamento dos tecidos oculares e perioculares, induzido pela ação dos conservantes, estaria também relacionado à falência de tratamentos cirúrgicos em usuários crônicos de análogos de prostaglandina<sup>82,84,86</sup>.

Ainda com relação aos efeitos citotóxicos dos análogos de PG, estudos observaram apoptose das células epiteliais da conjuntiva e da córnea, que seriam decorrentes da ativação do sistema de remodelagem tecidual e homeostase controlado pela ação das metaloproteinases e que estas teriam sua secreção estimulada pelos análogos de prostaglandinas tópicos<sup>87</sup>.

### 1.3 Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMP) são um grupo de enzimas zinco-dependentes, de estrutura e sequência similares, que possuem um peptídeo sinalizador (PRE), um pró-peptídeo (PRO), um domínio catalítico  $Zn^{2+}$  e um terminal

C semelhante a hemopexina.

O principal papel delas é degradar componentes da matriz extracelular como colágeno, laminina, fibronectina, elastina, hialuronan e proteoglicanos, promovendo o remodelamento tecidual e manutenção da homeostase. Atualmente sabe-se que essa função se entende à regularização de funções celulares como apoptose, proliferação, diferenciação, angiogênese, migração, invasão, metástase, reações imunológicas e reações inflamatórias<sup>88</sup>.

As MMPs se dividem em sete grupos conforme a preferência de substratos e organização do domínio catalítico: colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases, metaloelastases, metaloproteinases tipo membranas e outros tipos de MMP. Em tecidos saudáveis se encontra em níveis basais e na forma inativa ou zimógena e precisa ser clivada entre o pró-peptídeo e o domínio catalítico para se tornar ativa<sup>88</sup>.

A atividade das metaloproteinases são controladas e a expressão delas pode ser induzida em respostas à presença de citocinas, interleucinas, interferons, hormônios, e de vários fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de derivado plaquetário, fator de necrose tumoral, fator de crescimento de queratinócitos e fator de transformação de crescimento beta)<sup>89</sup>.

A inibição da expressão das MMP pode ser controlada pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP), que são altamente específicos, ou de modo inespecífico, por proteases como  $\alpha$ 1-proteinase ou  $\alpha$  2-macroglobulina<sup>89</sup>.

As MMP estão presentes em quase todos os tecidos corpóreos de anfíbios a mamíferos e diferentes tipos celulares podem secretar essas enzimas tais como queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, monócitos, linfócitos e macrófagos. Nos tecidos oculares já foram detectadas na córnea, esclera, conjuntiva, úvea, malha trabecular e retina<sup>89,90</sup>.

O envolvimento das metaloproteinases nas alterações da superfície ocular relacionadas ao uso crônico de análogos de prostaglandinas tem sido interrogado em função da expressão destas enzimas estar aumentada nos tecidos oculares expostos aos efeitos destas drogas. Elas seriam um marcador da influência da medicação anti-glaucoma na conjuntiva<sup>91-94</sup>.

Estudos recentes mostram que o aumento das MMPs na conjuntiva de

---

pacientes com glaucoma pode influenciar o sucesso das cirurgias filtrantes para controle da pressão intraocular, e que o equilíbrio entre as MMPs e os TIMPs pode desempenhar um papel crucial no processo de cicatrização da ferida conjuntival nos pós operatório<sup>95-97</sup>.

#### **1.4 Justificativa para o Estudo**

Devido ao uso crescente dos análogos de prostaglandina tópicos por longos períodos de tempo no tratamento do glaucoma; à escassez de estudos experimentais comparando as três principais drogas disponíveis no mercado com o efeito do conservante isolado; e a necessidade de esclarecimento do papel das metaloproteinases no processo de reorganização tecidual induzido pelas prostaglandinas, nos propusemos a realizar o presente estudo.

*Objetivo*

---

## **2. OBJETIVO**

2.1 O objetivo deste estudo foi:

Avaliar a conjuntiva de coelhos submetidos a tratamento ocular tópico com análogos de prostaglandinas e solução conservante, por meio de estudo histológico, morfométrico e imuno-histoquímico.

# *Material e Métodos*

---



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi protocolada na Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, sob o protocolo FMB – PE-744/2009.

#### **3.1 Animais utilizados**

Foram utilizados 40 coelhos adultos sadios da raça Norfolk, de ambos os sexos, com peso entre 1500 e 2500g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais com alimentação e ingestão hídrica “ad libitum”. Após o período de aclimação no Biotério, os animais foram distribuídos por sorteio, segundo a tabela de números casuais, em grupos experimentais, como se segue:

#### **3.2 Grupos experimentais**

- 3.2.1 Grupo G1 (bimatoprost) - formado por 12 coelhos, que tiveram seus olhos direitos (OD) tratados com uma gota diária de colírio de bimatoprost 0,03% com conservante cloreto benzalcônio a 0,005%.
- 3.2.2 Grupo G2 (travoprost) - formado por 12 coelhos que tiveram os OD tratados com uma gota diária de colírio de travoprost 0,004% com conservante cloreto benzalcônio a 0,015%.
- 3.2.3 Grupo G3 (latanoprost) - formado por 12 coelhos que tiveram os OD tratados com uma gota diária de colírio de latanoprost 0,005% com conservante cloreto benzalcônio a 0,02%.
- 3.2.4 Grupo G4 (solução conservante placebo) - formado por quatro coelhos, que tiveram os OD tratados com uma gota diária de solução conservante placebo (solução manipulada com 0,005% de cloreto de benzalcônio).

Os olhos esquerdos dos quatro grupos experimentais serviram de controle sem tratamento.

### 3.3 Momentos experimentais

3.3.1 - M0: Foi considerado momento zero, o dia do sorteio para todos os grupos experimentais, antes do início da instilação dos colírios.

3.3.2 - M15: Quinze dias após o início da instilação dos colírios.

3.3.3 - M30: Trinta dias após o início da instilação dos colírios. Eutanásia de metade dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4.

3.3.4 - M45: Quarenta e cinco dias após o início da instilação dos colírios.

3.3.5 - M60: Sessenta dias após o início da instilação dos colírios. Eutanásia da outra metade dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4.

A enucleação de ambos os olhos dos coelhos foi realizada antes da eutanásia nos momentos M30 e M60.

### 3.4 Atributos estudados

Para atender às finalidades do experimento, os seguintes atributos foram estudados a partir de M0:

#### 3.4.1 Avaliação Clínica

Foram avaliados em cada animal nos momentos M0, M15, M30, M45 e M60: cílios, conjuntiva, e pressão intraocular (PIO), por meio de exame ocular em microscópio e documentação fotográfica.

#### 3.4.2 Avaliação Histo-morfométrica

Foi realizada análise qualitativa e morfométrica das alterações histológicas e do infiltrado inflamatório conjuntival e nos momentos M30 e M60, por meio de exame histopatológico com a coloração de Hematoxilina e eosina (HE), de acordo com a técnica padronizada pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu - UNESP. As fotografias do epitélio e do estroma conjuntival foram obtidas com a Plataforma *Cell Sens Standard* (Olympus, EUA), acoplada a um microscópio Olympus BX53, no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP. A análise morfométrica foi

realizada com o Programa ImageJ, (*Image Processing and Analysis in Java*).

### 3.4.3 Imuno-histoquímica

A presença da metaloproteinase 2 na conjuntiva dos coelhos foi pesquisada por imuno-histoquímica, conforme a expressão de suas matrizes. A análise foi realizada, conforme padronização do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu – UNESP.

## 3.5 Sequência das etapas experimentais

Em todos os animais realizou-se a seguinte sequência experimental:

1. Pesagem do animal.
2. Identificação numérica do animal com caneta hidrográfica na orelha direita.
3. Sorteio dos animais para formação dos grupos G1, G2, G3 e G4.
4. Manutenção dos animais em gaiolas individuais com alimentação e ingestão hídrica “ad libitum”.
5. Instilação de uma gota dos colírios: bimatoprost 0,03% (grupo G1), travoprost 0,004% (grupo G2), latanoprost 0,005% (grupo G3), e solução conservante placebo (grupo G4) nos olhos direitos dos animais, no período da manhã, diariamente.
6. Instilação de colírio anestésico (Cloridrato de tetracaína 1% + cloridrato de fenilefrina 0,1%) e aferição da pressão intraocular com tonômetro de aplanção (Tono-pen XL), a cada quinze dias.
7. Registro fotográfico dos olhos dos animais nos momentos M0 e M30 e M60.
8. Posicionamento na goteira de Claude Bernard em decúbito lateral e anestesia endovenosa nos momentos M0, M15, M30 de metade dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 para exame ocular com microscópio e avaliação dos parâmetros clínicos.
9. Anestesia endovenosa de metade dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 para enucleação de ambos os olhos no momento M30.

10. Posicionamento na goteira de Claude Bernard em decúbito lateral e anestesia endovenosa nos momentos M0, M15, M30 M45 e M60 da outra metade dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 para exame ocular com microscópio cirúrgico e avaliação dos parâmetros clínicos.
11. Anestesia endovenosa da outra metade dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 para enucleação de ambos os olhos no momento M60.
12. Eutanásia de metade dos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4, após a enucleação de ambos os olhos no momento M30 e da outra metade no momento M60.
13. Processamento dos olhos dos animais para exame histopatológico e análise imuno-histoquímica.

### **3.6 Técnicas utilizadas**

#### **3.6.1. Administração dos colírios**

Uma gota dos colírios de análogos de prostaglandinas: Grupo G1 - Bimatoprost 0,03% (0,005% de conservante), Grupo G2 - Travoprost 0,004% (0,015% de conservante), Grupo G3 - Latanoprost 0,005% (0,02% de conservante); e de solução conservante placebo (Grupo G4 - cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico heptahidratado, ácido cítrico monoidratado, cloreto de benzalcônio 0,005% e água purificada qsp), Ophthalmos (Ophthalmos Fórmulas Oficinas Ltda. São Paulo – Brasil); foram administrados no fundo de saco conjuntival inferior dos olhos direitos dos animais, vez ao dia, entre 8 e 9 horas pela manhã.

#### **3.6.2 Anestesia**

Os animais foram anestesiados com injeção de Zoletil® a 5% (Cloridrato de tiletamina 125mg +cloridrato de zolazepam 125mg + excipiente 660 MG em 5 ml de água estéril) -Virbac® - Virbac do Brasil Ltda., São Paulo- Brasil, na dose 10mg/Kg associado à Virbaxyl 2% - 0.05 mg/Kg (Cloridrato de xilazina 0,2 mg em 10 ml de água estéril) Virbac® - Virbac do Brasil Ltda. São Paulo- Brasil, na veia marginal da orelha com seringa de 3 ml e agulha 25X7(22G). Quando necessário, foi administrada dose complementar de 5 mg/Kg.

---

Uma anestesia tópica adicional foi feita com uma gota de colírio Anestésico<sup>®</sup> (Cloridrato de tetracaína 1% + cloridrato de fenilefrina 0,1%) ALLERGAN<sup>®</sup> - Allergan Produtos farmacêuticos Ltda. São Paulo - Brasil, antes da avaliação da pressão intraocular.

### 3.6.3 Exame oftalmológico

#### 3.6.3.1 Avaliação da hiperemia conjuntival

O exame ocular externo foi realizado com microscópio cirúrgico DF Vasconcelos - Valença - Brasil, após anestesia endovenosa e tópica, avaliando a conjuntiva quanto à presença ou ausência de hiperemia. A graduação da hiperemia conjuntival foi obtida pela ferramenta ImageJ, nos momentos M30 e M60, conforme modelo adaptado de Sakata et al.<sup>98</sup>, sendo:

- zero a 1,99 mm para ausência de hiperemia,
- 2 a 4,99 mm para 1+;
- 5 a 9,9 mm para 2+;
- 10 a 10,99 mm para 3+;
- e acima de 10,99 mm para 4+ (Figuras de 9 a 16)



**Figura 9.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival zero em avaliação com 30 dias. Coelho 29, Grupo G1 Bimatoprost.



**Figura 10.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 1+ em avaliação com 30 dias. Coelho 10, Grupo G2 Travoprost.



**Figura 11.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 2+ em avaliação com 30 dias. Coelho 26, Grupo G3 Latanoprost.



**Figura 12.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 3+ em avaliação com 30 dias. Coelho 40, Grupo G4 Placebo.



**Figura 13.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival zero em avaliação com 60 dias. Coelho 18, Grupo Bimatoprost.



**Figura 14.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 1+ em avaliação com 60 dias. Coelho 23, Grupo Latanoprost.



**Figura 15.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 2+ em avaliação com 60 dias. Coelho 30, Grupo Travoprosta.



**Figura 16.** Exemplo de graduação da hiperemia conjuntival 4+ em avaliação com 30 dias. Coelho 37, Grupo Bimatoprosta.

### 3.6.3.2 Tonometria de aplanção

A tonometria de aplanção foi realizada, após anestesia endovenosa e tópica, com o animal posicionado em decúbito lateral, utilizando tonômetro de aplanção Tonopen XL® (*Meditronic Solan*, Jacksonville, Estados Unidos da América). Foram realizadas três medidas em cada olho.



#### 3.6.4 Documentação Fotográfica

Os parâmetros clínicos foram registrados por fotografia, utilizando-se máquina fotográfica digital marca Nikon® Modelo D40 - *Nikon Corporation*, Tóquio – Japão nos momentos M0, M30 e M60.

#### 3.6.5 Eutanásia

Os animais foram sacrificados após anestesia endovenosa e enucleação de ambos os olhos, usando-se sobre dose de Zoletil® a 5% e Virbaxyl 2%, por via intramuscular, nos tempos idealizados para a pesquisa (M30 e M60).

#### 3.6.6 Enucleação

Os olhos foram enucleados conforme técnica convencional, obedecendo as seguintes etapas:

- Posicionamento do blefarostato de Barraquer;
- Peritomia limbar;
- Secção dos músculos oculares externos;
- Secção do nervo óptico.

#### 3.6.7. Preparo da conjuntiva dos olhos dos coelhos para exame histopatológico

Após a enucleação, os olhos foram acondicionados em frasco contendo formol a 10% e após 48 horas, colocados em frascos com álcool 70% e encaminhados para o Laboratório de histopatologia e imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu – UNESP para posterior inclusão e análise.

Em função da necessidade de interrupção do experimento após esta etapa da pesquisa, e da perda de viabilidade de parte do material estocado durante os oito anos de pausa, reduziu-se pela metade o número de olhos que foram submetidos ao processo de histotécnica em cada grupo, sendo a nova distribuição: três olhos para os Grupos 1, 2 e 3 e dois para o grupo placebo.

O processo de histotécnica seguiu padronização do Laboratório da histopatologia e imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, utilizando o aparelho de TP1020 Leica®, conforme a seguinte técnica:

1. Desidratação etanol 70%, 80% e 90% (1hora cada)
2. Desidratação etanol 100 % ou etanol absoluto (1hora, 3 vezes)
3. Clarificação Xilol I (1hora, 3 vezes)
4. Impregnação em parafina I (1hora, 3 vezes)

Os cortes foram feitos no micrótomo RM2155 Leica®, na espessura de 3 µm, após posicionamento na lâmina, selecionando a conjuntiva nasal e então corados com HE (Hematoxilina-Eosina).

#### 3.6.7.1 Técnica para HE Hematoxilina e eosina (HE)

- 1 - Fazer a inclusão (emblocar);
- 2 - Cortar material com 4microns;
- 3 - Colocar as lâminas em estufa a 85° por 25 minutos (desparafinização);
- 4 - Passar rapidamente por 3 vezes em xilol e 4 vezes em álcool;
- 5 - Lavar em água corrente;
- 6 - Colocar em corante de hematoxilina por 8 minutos (podendo chegar a 13);
- 7 - Lavar em água corrente rápido;
- 8 - Passar pelo diferenciador para tirar excesso de corante;
- 9 - Deixar em água corrente por 5 minutos (azulecer cortes);
- 10 - Passar em álcool absoluto, rápido;
- 11 - Colocar em eosina por 2 minutos;
- 12 - Passar 4 vezes em álcool e 3 vezes em xilol - montar em meio sintético (PELMONT)

#### 3.6.7.2 Técnica de Histo-morfometria

A histo-morfometria foi feita por meio de ferramentas virtuais (régua) que permitem ao operador medir estruturas, mensurar áreas e localizar estruturas de mesma coloração para posterior contagem ou mensuração. Os seguintes parâmetros foram avaliados em segmentos da conjuntiva pré-delimitados aleatoriamente:

1. Espessura do epitélio conjuntival em µm
2. Espessura do estroma conjuntival em µm

### 3.6.8 Imuno-histoquímica (Metaloproteinase 2)

O procedimento seguiu padronização do Laboratório de imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu – UNESP. Após salinização, as lâminas foram coradas pela seguinte técnica:

MMP-2 (controle positivo: baço e rim)

1. Desparafinalização;
2. Hidratação: (Xilol I (10 minutos), Xilol II (10 minutos), álcool absoluto, 95%, 70%, 50%, lavar em água destilada (cinco minutos cada  $\mu\text{m}$ );
3. Desmascaramento antigênico: em banho maria por 20 minutos (97 °C) em solução tampão ácido cítrico pH 6,0;
4. Deixar esfriar por 20 minutos e depois lavar com TRIS (8g Trizma ,6,5 g de NaCl em 1litro de água destilada, adicionar ácido clorídrico até atingir a faixa de pH 7,2-7,6), pH 7,4, duas vezes por 5min;
5. Bloqueio da peroxidase endógena: peroxidase *block* (Leica biosystems, UK) duas vezes por 5 min em temperatura ambiente;
6. Lavagem em solução TRIS, duas vezes por 5min.
7. Bloqueio de proteína: Novolink<sup>TM</sup> peroxidase block (Leica biosystems, UK), duas vezes por 5 min em temperatura ambiente;
8. Lavagem em solução TRIS, duas vezes por 5min;
9. Anticorpo Primário: MMP-2, Clone: A-gel VC2 Immunogen: BALB/C mice were injected with human APMA activated native 72 kDa MMP-2 protein. Isotype: IgG1 (Diagnostic Biosystems), diluição 1:500 (incubar overnight (24 h), na geladeira, 4°C);
10. Lavagem em solução TRIS, duas vezes por 5 min;
11. Solução pós-primaria: (HRP Envision, DAKO, Carpinteria, CA, USA) - incubar por 60 min em câmara úmida em temperatura ambiente;
12. Lavagem em solução TRIS, duas vezes por 5 min.
13. Crómogeno: Revelar as marcações com DAB (DAB em tampão tris 0,05M pH 7,6) por 2 a 7 min. (1:20 / 5  $\mu\text{l}$  de cromógeno y 100  $\mu\text{l}$  de sustrato). Temperatura ambiente;

14. Lavagem com água corrente, três vezes;
15. Contra-coloração: Contra-corar com Hematoxilina de Meyer por 1 min;
16. Lavagem em água corrente de 5 a 10 min;
17. Desidratação, diafinização e montagem; álcool 70%, 95% e xilol absoluto e, em seguida montar as lâminas com resina sintética e colocar lamínula.

### **3.7. Análise estatística**

A comparação de médias foi feita utilizando um modelo linear generalizado com distribuição gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald (dados com distribuição assimétrica). O teste qui-quadrado foi utilizado para diferença de proporções. Em todos os testes foi fixado no nível de significância de 5%. Todas as análises foram feitas no programa SAS for Windows, v.9.4.

# *Resultados*

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação Clínica

#### 4.1.2. Mensuração da hiperemia conjuntival

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Hiperemia conjuntival dos 40 animais com 30 dias.

Grupos	Graus de hiperemia					Total
	0	1	2	3	4	
<i>Bimatoprost</i>	8	3				12
<i>Travoprost</i>	3	8	1			12
<i>Latanoprost</i>	8	2	2			12
<i>Cons/placebo</i>	3			1		4

**Tabela 2.** Hiperemia conjuntival dos 20 animais com 60 dias.

Grupos	Graus de hiperemia					Total
	0	1	2	3	4	
<i>Bimatoprost</i>	5		1			6
<i>Travoprost</i>	4	2				6
<i>Latanoprost</i>	5	1				6
<i>Cons/Placebo</i>	2					2

#### 4.1.3. Mensuração da Pressão Intraocular (PIO)

Os resultados da aferição da PIO dos olhos dos coelhos dos quatro grupos experimentais durante o experimento são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Pressão intraocular média dos olhos dos coelhos tratados com análogos de prostaglandina e solução conservante placebo aos 30 e 60 dias.

Grupos	OD M30		OE M30		OD M60		OE M60	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Bimatoprost	12,26	2,57	13,49	3,11	13,38	1,75	16,00	2,56
Travoprost	11,19	1,88	13,40	2,44	13,50	1,64	15,83	1,55
Latanoprost	11,43	2,12	13,15	2,38	12,29	1,68	14,92	1,89
Cons/placebo	12,13	1,87	13,63	1,50	12,13	2,17	15,25	1,19

OD: olho direito; OE: olho esquerdo; DP: Desvio padrão; M30: 30 dias; M60: 60 dias.

#### 4.2. Avaliação Histo-morfométrica

Na Tabela 4 estão os resultados da morfometria do epitélio conjuntival dos olhos direitos dos coelhos submetidos à tratamento por 30 dias e 60 dias com análogos de prostaglandinas e solução conservante placebo.

**Tabela 4.** Espessura epitelial média ( $\mu\text{m}$ ) da conjuntiva de coelhos, após 30 e 60 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e solução conservante placebo.

Epitélio	Bimatoprost		Travoprost		Latanoprost		Cons/placebo		p-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
30 dias	65,23	25,81	48,33	25,62	<b>89,63</b>	64,45	29,4	15,90	<0,0001
	*aA**		cA		dA		bA		
60 dias	<b>73,72</b>	29,33	65,47	34,86	32,28	15,21	34,39	16,14	<0,0001
	aA		aB		bB		bB		

DP: desvio padrão; p: valor estatístico. \*Médias seguidas de mesma letra minúscula (fixando agudo e crônico) não diferem significativamente pelo teste de Wald. \*\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula (fixando os tratamentos) não diferem significativamente pelo teste de Wald.

Na comparação entre os grupos tratados (letras minúsculas), com 30 dias de experimento:

1. Houve diferença estatisticamente significativa da espessura epitelial média, sendo que o grupo latanoprostá apresentou a maior espessura (<0,0001).

Com 60 dias de experimento:

1. O grupo bimatoprostá apresentou maior espessura epitelial média.
2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos bimatoprostá e travoprostá e entre os grupos latanoprostá e conservante placebo.

Comparando-se os valores de 30 e 60 dias de cada grupo tratado (letras maiúsculas):

1. Não houve diferença estatisticamente significativa da espessura epitelial média no grupo bimatoprostá entre os momentos.
2. Houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos 30 e 60 dias, nos grupos travoprostá, latanoprostá e conservante placebo.
3. O grupo latanoprostá apresentou redução da espessura epitelial média com 60 dias.

A Tabela 5 mostra os valores de espessura epitelial média de olhos esquerdos (grupo controle não tratado), para estabelecimento de valores normais de referência.

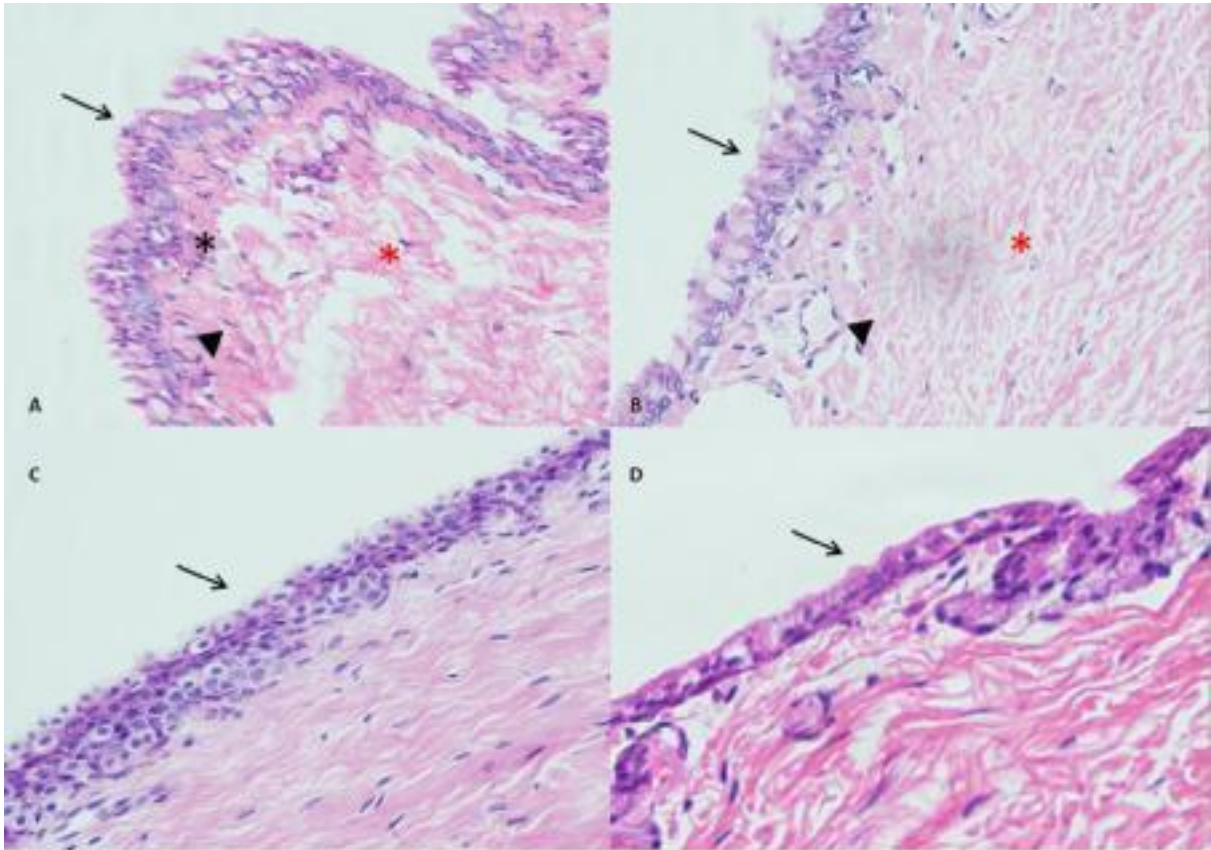
**Tabela 5.** Espessura epitelial média ( $\mu\text{m}$ ) da conjuntiva de olhos esquerdos, não tratados.

Epitélio	Bimatoprostá		Travoprostá		Latanoprostá		Cons/placebo		p-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
	15,93	4,10	16,36	4,22	19,51	9,09	23,26	11,72	<0,000
	a		a		c		b		1

DP: desvio padrão; p: valor estatístico.



A Figura 17 mostra as alterações histológicas encontradas no epitélio conjuntival dos olhos direitos dos coelhos dos quatro grupos experimentais no momento M30.



**Figura 17:** Fotomicrografias de amostras de epitélio conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M30. Coloração HE. Aumento 400x.

A) Grupo Bimatoprost 0,03%: Observa-se aumento da espessura do epitélio com degeneração vacuolar e perda de relação núcleo citoplasma, além de diminuição do número das células caliciformes (seta) e corpos apoptóticos na base do epitélio (picnose, cariólise e cromatólise), (cabeça de seta). Nota-se também infiltrado inflamatório epitelial e no estroma adjacente ao epitélio (linfócitos) (asterisco) e discreto edema do tecido conjuntivo (asterisco vermelho).

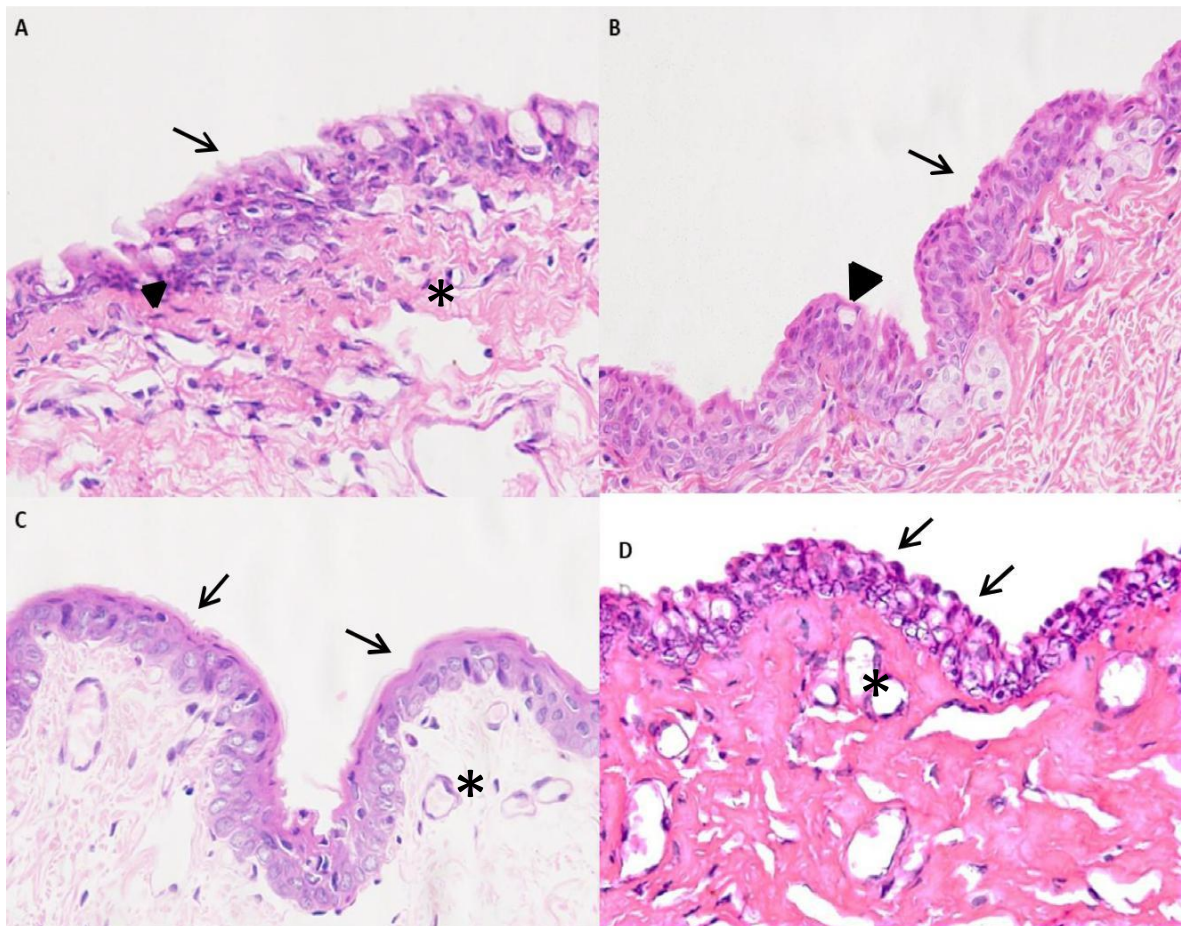
(B) Grupo Travoprost 0,004%: Evidencia-se menor espessura do epitélio, degeneração vacuolar discreta, alteração das células da membrana basal e diminuição do número das células caliciformes (seta). Observa-se neovascularização discreta (cabeça de seta) e edema tecido conjuntivo discreto (asterisco vermelho).

(C) Grupo Latanoprost 0,005%: Evidencia-se aumento da espessura do epitélio e alteração das células da membrana basal (seta).

(D) Grupo solução conservante placebo: Observa-se menor espessura do epitélio (seta).

Em A, B e D houve intensa alteração do formato celular típico do epitélio conjuntival.

A Figura 18 mostra as alterações histológicas encontradas no epitélio conjuntival dos olhos direitos dos coelhos dos quatro grupos experimentais no momento M60.



**Figura 18:** Fotomicrografias de amostras de epitélio conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M60. Coloração HE. Aumento 400x.

(A) Grupo Bimatoprost 0,03%: Observa-se aumento da espessura do epitélio associado à metaplasia do epitélio, degeneração vacuolar, além de hiperplasia das células caliciformes (seta) e corpos apoptóticos (picnose, cariólise e cromatólise) (cabeça de seta). Nota-se também desorganização do estroma

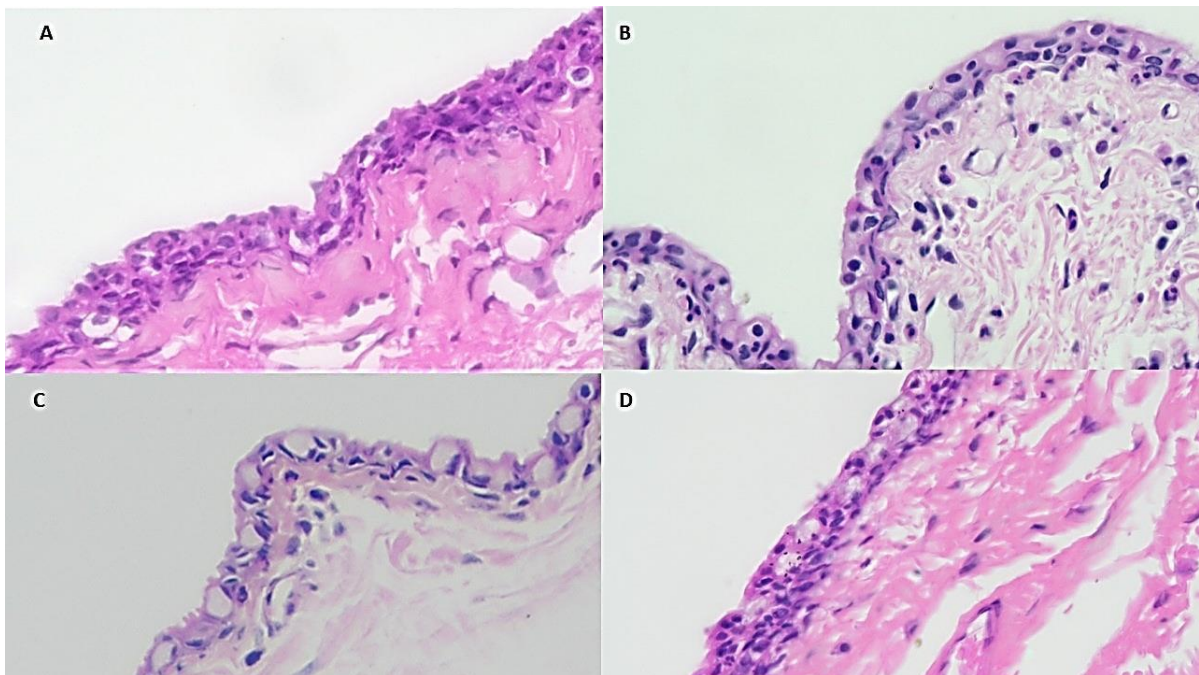
discreta. (asterisco).

(B) Grupo Travoprosta 0,004%: Evidencia-se aumento da espessura do epitélio associado à metaplasia moderada (SETA), além de diminuição do número das células caliciformes (cabeça de seta).

(C) Grupo Latanoprosta 0,005%: Nota-se diminuição da espessura do epitélio associado à metaplasia escamosa com queratinização moderada e difusa e perda de células caliciformes acentuadas (seta). Observa-se também neovascularização discreta (asterisco).

(D) Grupo solução conservante placebo: Nota-se aumento da espessura do epitélio associado à hiperplasia e não diferenciação celular intensa (anaplasia) com aumento da relação núcleo/citoplasma (seta). Evidencia-se também neovascularização discreta (asterisco).

A Figura 19 mostra microfotografias de amostras de conjuntiva dos olhos esquerdos (não tratados) dos quatro grupos experimentais.



**Figura 19:** Fotomicrografias de amostras de epitélio conjuntival de olhos esquerdos não tratados. Coloração HE. Aumento 400x.

Em A, B, C e D nota-se leve alteração da morfologia típica do tecido epitelial com a presença de diversos tamanhos celulares e células com pouco citoplasma e nucleadas. Foram observadas células caliciformes em B e C.



Na Tabela 6 estão os resultados da morfometria do estroma conjuntival dos coelhos submetidos à tratamento por 30 e 60 dias com análogos de prostaglandinas e solução placebo.

**Tabela 6.** Espessura estromal média ( $\mu\text{m}$ ) do estroma de coelhos, após 30 e 60 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e solução conservante placebo.

	Bimatoprosta		Travoprosta		Latanoprosta		Cons/placebo		p-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
30 dias	509,74	191,42	557,46	280,07	<b>849,38</b>	324,63	298,14	129,42	<0,0001
	aA		aA		cA		bA		
60 dias	<b>830,08</b>	339,73	602,11	183,87	495,89	158,65	359,53	158,85	<0,0001
	aB		cA		dB		bB		

DP: desvio padrão; p= valor estatístico.

Na comparação entre os grupos tratados (letras minúsculas): com 30 dias de experimento:

- Os três grupos de análogos de prostaglandina apresentaram aumento de espessura estromal, sendo que entre os grupos bimatoprosta e travoprosta não houve diferença estatisticamente significativa, mas houve entre cada um deles e os outros grupos.
- O grupo latanoprosta apresentou a maior espessura estromal média.

Com 60 dias de experimento:

- Todos os grupos apresentaram diferiram estatisticamente entre si, sendo que o grupo bimatoprosta apresentou a maior espessura estromal média.

Comparando-se os valores de 30 e 60 dias de cada grupo tratado (letras maiúsculas):

- O Grupo travoprosta não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois momentos apesar de ter havido aumento de espessura estromal no período do experimento.

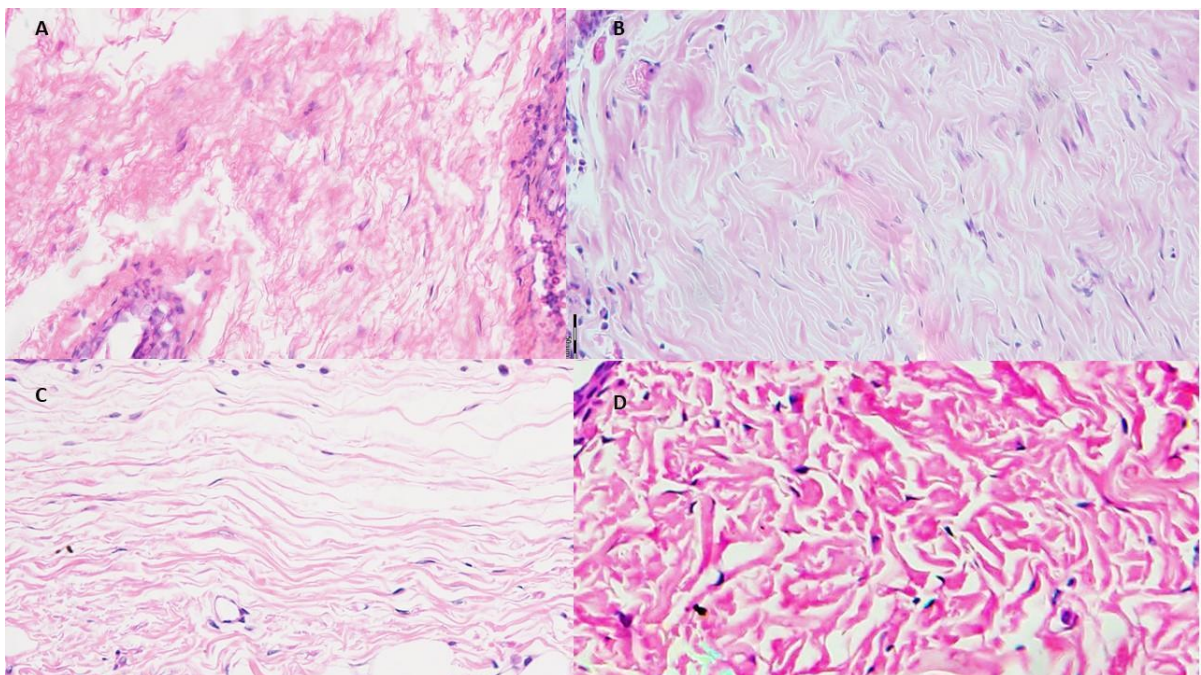
2. Houve diferença estatisticamente significativa na média de espessura estromal entre os dois momentos, nos outros 3 grupos: bimatoprost, latanoprost e conservante placebo, porém no grupo latanoprost houve redução da espessura na segunda metade do experimento.

A Tabela 7 mostra os valores de espessura estromal média dos olhos esquerdos (grupo controle não tratado), para estabelecimento de valores normais de referência.

**Tabela 7** Espessura estromal média ( $\mu\text{m}$ ) da conjuntiva de olhos esquerdos de coelhos, não tratados.

	Bimatoprost		Travoprost		Latanoprost		Cons/placebo		p-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Estroma	166,37	25,35	158,23	25,57	194,17	22,01	151,3	68,88	<0,0001
	a		a		b		a		

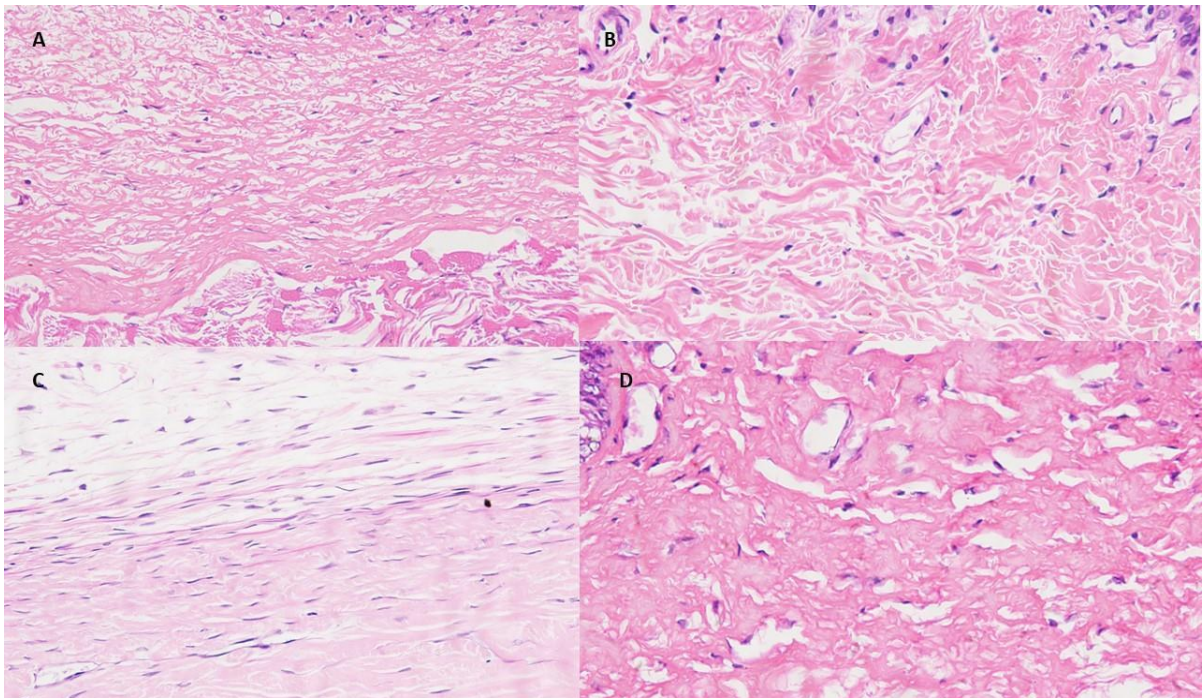
A Figura 20 mostra as alterações histológicas encontradas no estroma conjuntival dos olhos direitos dos coelhos dos quatro grupos no momento M30.



**Figura 20:** Fotomicrografias de amostras de estroma conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M30. Coloração HE. Aumento 400x.

Nota-se em A (Bimatoprosta 0,03%) e C (Latanoprosta 0,005%) rearranjo arquitetural das fibras colágenas e em C, que as fibras se apresentam mais delgadas e com grande espaçamento entre elas. Já em B (Travoprosta 0,004%) e D (conservante placebo) nota-se a organização típica das fibras estromais.

A Figura 21 mostra as alterações histológicas encontradas no estroma conjuntival dos olhos direitos dos coelhos dos quatro grupos no momento M60.

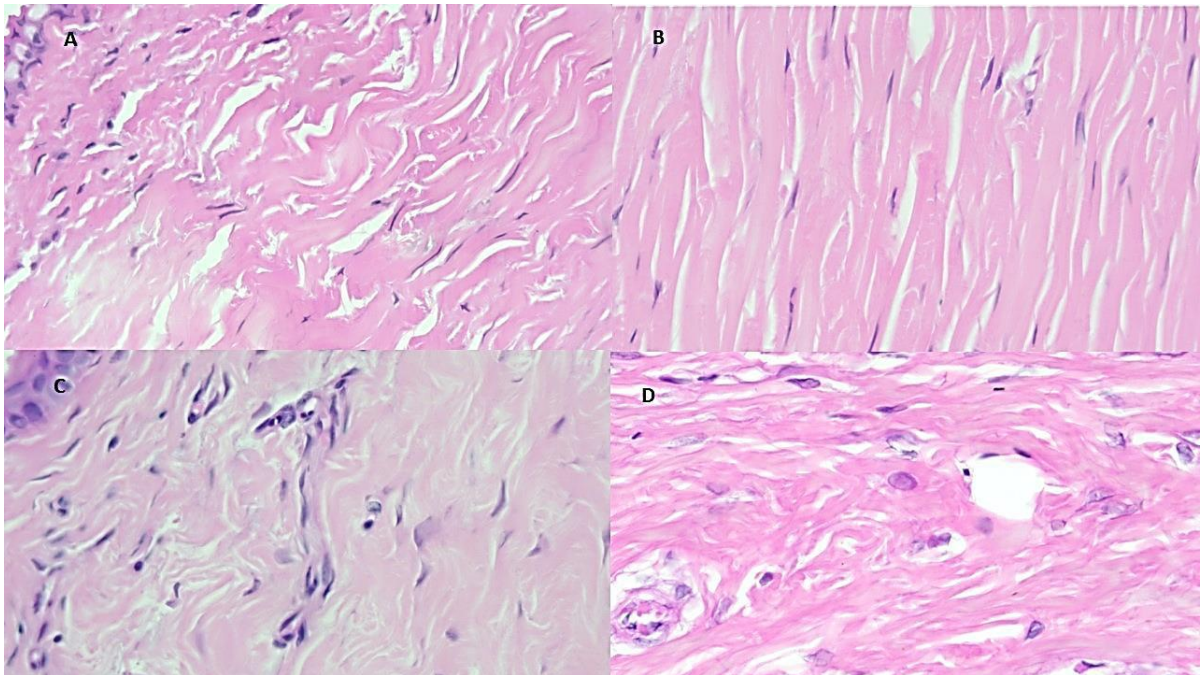


**Figura 21:** Fotomicrografias de amostras de estroma conjuntival dos olhos tratados com Bimatoprosta (A), Travoprosta (B), Latanoprosta (C) e solução conservante placebo (D), no momento M60. Coloração HE. Aumento 400x.

Em A, B e D observa-se rearranjo tecidual das fibras colágenas e em C adelgaçamento das fibras, com grande espaçamento entre as mesmas.

A Figura 22 mostra microfotografias de amostras de conjuntiva dos olhos esquerdos (não tratados) dos quatro grupos experimentais.





**Figura 22:** Fotomicrografias de amostras de fibras do tecido estromal de olhos esquerdos (não tratados) (D). Coloração HE. Aumento 400x.

### 4.3. Avaliação imuno-histoquímica

Na Tabela 8 estão os resultados da expressão da metaloproteinase 2 - MMP2 na conjuntiva dos coelhos submetidos à tratamento com análogos de prostaglandinas e solução placebo, por 30 dias e 60 dias.

**Tabela 8.** Expressão da MMP2 na conjuntiva dos coelhos tratados com 30 e 60 dias.

MMP2	Bimatoprost		Travoprost		Latanoprost		Cons/placebo		p-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
30 dias	27,46 aA	16,10	2.45 cA	2,00	86.44 dA	30,14	13.33 bA	18,28	<0,000 1
60 dias	20.07 aA	12,65	7.01 bB	1,61	0.59 cB	0,60	14.85 aA	17,10	

DP: desvio padrão; p=valor estatístico

Na comparação entre os grupos tratados (letras minúsculas):

Com 30 dias de experimento:

1. Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si em com 30 dias, sendo que a expressão da MMP2 no grupo travoprost foi muito baixa e no grupo latanoprost muito alta.

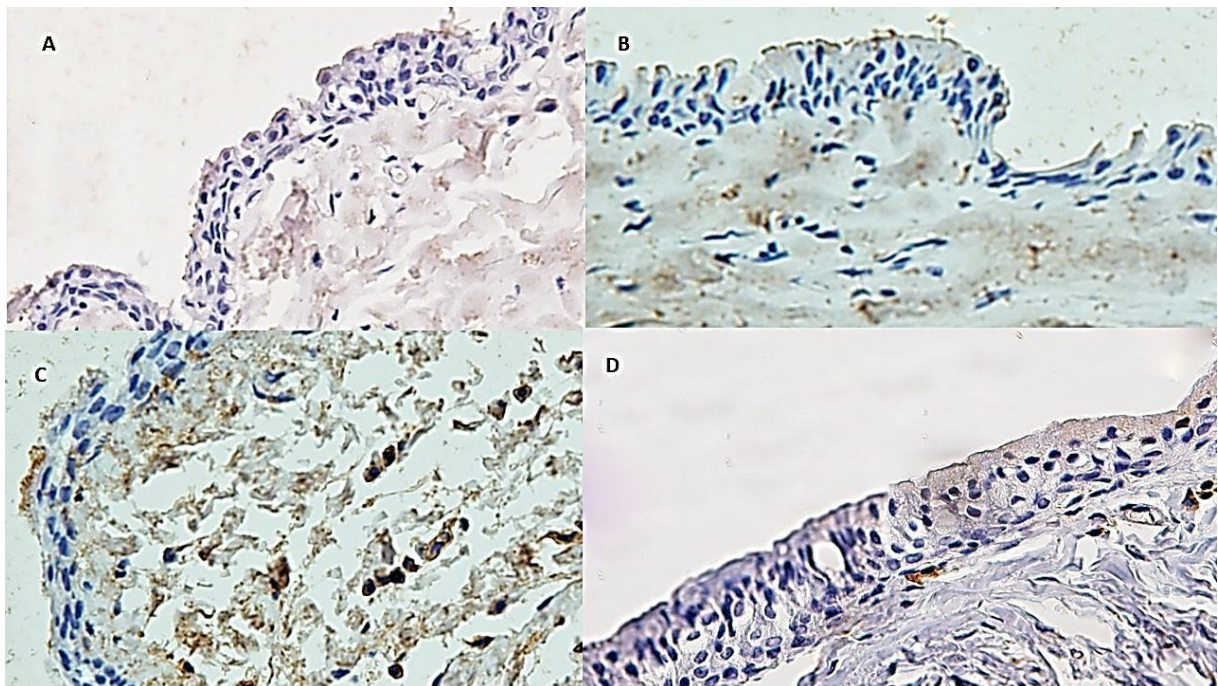
Com 60 dias de experimento:

1. A expressão dos grupos bimatoprostá e conservante placebo não diferiu estatisticamente, porém foi bem maior que a dos grupos travoprostá e latanoprostá.

Comparando-se os valores de 30 e 60 dias de cada grupo tratado (letras maiúsculas):

1. O grupo travoprostá e latanoprostá apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão da MMP2 entre os momentos 30 e 60, com comportamentos diferentes: no grupo travoprostá houve pequeno aumento de expressão e no grupo latanoprostá grande redução.
2. Os grupos Bimatoprostá e cons/placebo não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os dois momentos experimentais, mantendo valores semelhantes de expressão de MMP2.

A Figura 23 exibe a expressão da metaloproteinase 2 (MMP2) na conjuntiva dos coelhos dos quatro grupos experimentais no momento M30.

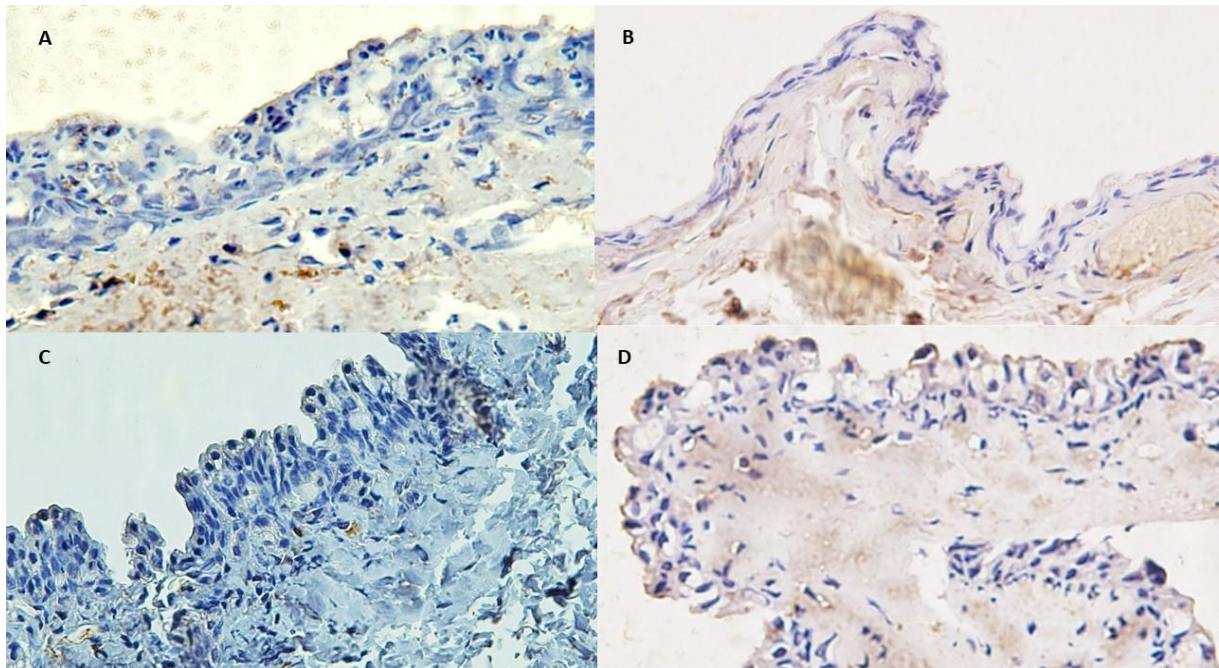


**Figura 23:** Conjuntiva dos olhos tratados com Bimatoprostá (A), Travoprostá (B), Latanoprostá (C) e solução conservante placebo (D), no momento M30, apresentando marcação pela metaloproteinase 2 (MMP2).



Em A, nota-se leve coloração de células do epitélio e leve marcação difusa do estroma. Em B, observa-se leve positividade para a MMP2 difusa no estroma. Em C, nota-se marcação moderada nas células do estroma. Em D, reação difusa em estroma com pouca expressão da MMP2.

A Figura 24 exhibe a expressão da metaloproteinase 2 (MMP2) na conjuntiva dos coelhos dos quatro grupos experimentais no momento M60.



**Figura 24:** Conjuntiva dos olhos tratados com Bimatoprost (A), Travoprost (B), Latanoprost (C) e solução conservante placebo (D), no momento M60, apresentando marcação pela metaloproteinase 2.

Em A, B e D nota-se baixa expressão da MMP2 difusa no estroma. Em C, não se nota expressão da MMP2.

A Figura 25 mostra microfotografias de amostras de conjuntiva de olhos esquerdos (não tratados), submetidas à imuno-histoquímica para pesquisa de MMP2.



# *Discussão*

---

## 5. DISCUSSÃO

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o uso contínuo de prostaglandinas sintéticas tópicas altera a morfologia e a fisiologia da superfície ocular (SO) e de estruturas periorculares, tanto por efeito do princípio ativo destes fármacos, como por ação de conservantes<sup>99-101</sup>. Estas alterações não causam apenas olhos secos, hiperemia, prurido, fotofobia e outros desconfortos, mas também potencialmente aumentam o risco de falha das cirurgias filtrantes em pacientes com glaucoma<sup>102</sup>.

O papel dos conservantes neste processo ainda não está totalmente esclarecido, assim como o do possível efeito protetor de alguns análogos de prostaglandinas contra a potencial toxicidade destas substâncias. O equilíbrio entre a inflamação e a reparação tecidual parece ser o elemento chave para a manutenção da integridade da SO.

### 5.1. Avaliação clínica

A hiperemia conjuntival é um dos efeitos colaterais locais mais frequentes em usuários de análogos de prostaglandinas<sup>98,103</sup>. Cerca de 60% dos pacientes com glaucoma em tratamento medicamentoso, apresentam alguma queixa relacionada a alterações da superfície ocular e 40% têm sintomas de desconforto<sup>97</sup>.

Os resultados da avaliação clínica com relação à hiperemia no presente estudo, foram compatíveis com os momentos experimentais em que foram feitas as medidas (30 e 60 dias)<sup>104</sup>. Na leitura de 30 dias, a hiperemia foi leve na maioria dos coelhos, nos três grupos tratados com AP, acometendo 9 de 12 coelhos no grupo travatoprostá, e 4 de 12 coelhos nos grupos bimatoprostá e latanoprostá. Somente um coelho do grupo bimatoprostá apresentou hiperemia intensa com quemose.

Na avaliação de 60 dias, houve redução no grau de intensidade da hiperemia e no número de coelhos acometidos (1 de 6 animais nos grupos bimatoprostá e latanoprostá e 2 de 6 no grupo travatoprostá). No grupo conservante placebo, apenas um coelho apresentou hiperemia moderada durante o todo o experimento.

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Trzeciecka et al., em coelhos submetidos à instilação de AP por 8 semanas, onde a proporção de

animais que apresentaram hiperemia foi de um 1 em cada quatro, nos grupos que receberam latanoprostá e bimatoprostá<sup>105</sup>.

Em outros estudos experimentais também há relatos de hiperemia conjuntival de intensidade variável, relacionada ao uso de análogos de prostaglandinas com conservantes<sup>106,107</sup>. Na década de 70, o coelho era o principal animal utilizado para estudar os efeitos dos AP na pressão intraocular. A aplicação tópica de 0,5 a 50 µg de prostaglandina E1 provocava um aumento dose-dependente da PIO associado à hiperemia ocular e à quebra da barreira hemato-aquosa<sup>108</sup>.

Estudos clínicos com pacientes usuários de AP, mostraram que a hiperemia conjuntival começa a ser identificada precocemente, horas após o início do tratamento, atingindo o pico de intensidade com dois dias, e decréscimo gradual após uma semana de uso<sup>109-112</sup>. A incidência de hiperemia, porém, é altamente variável nestes ensaios clínicos. Assim, a latanoprostá induz uma taxa de hiperemia variando entre 5% e 47%<sup>104,112-114</sup>, enquanto a bimatoprostá (8% a 58%)<sup>104,111,112,114-116</sup>, e a travoprostá (28% a 68%)<sup>104,110,112</sup>. A maioria destes estudos relatam uma incidência ligeiramente menor de hiperemia em pacientes tratados com a latanoprostá e maior com a bimatoprostá.

Algumas teorias são postuladas para explicar a hiperemia conjuntival após a utilização de AP. Astin et al., sugerem que a ativação da síntese do óxido nítrico, estimulada pelo aumento do fluxo de sangue para os olhos após a ação das prostaglandinas sobre os vasos sanguíneos, seria a responsável pela congestão ocular<sup>117</sup>. Outro estudo do mesmo grupo de autores, em coelhos cujos olhos foram submetidos à interrupção da inervação sensorial e instilação de prostaglandinas, mostrou que a hiperemia ocular, pelo menos na sua fase inicial, é mediada pelos nervos sensoriais<sup>118</sup>.

A ação dos conservantes na gênese da hiperemia, muito valorizada atualmente na literatura, está relacionada ao aumento de mediadores pró-inflamatórios e alterações da superfície ocular. Porém, no presente estudo, não se evidenciou hiperemia importante no grupo que só recebeu a solução conservante placebo. Este resultado pode ser atribuído à baixa concentração de cloreto de benzalcônio utilizada na solução conservante (0,005%), apesar desta ser a mesma utilizada na bimatoprostá, droga associada a uma frequência maior de hiperemia em vários estudos<sup>104,109,119</sup>.

A amostra menor de animais no grupo conservante também pode ter influenciado o resultado, subestimando a ocorrência da hiperemia.

Em relação à avaliação da pressão intraocular, os resultados deste estudo mostraram uma variação na pressão intraocular média de 11 a 16 mmHg, sendo que os olhos tratados apresentaram valores menores que os não tratados, como esperado. Durante a segunda metade do experimento, porém, houve um ligeiro aumento da pressão intraocular, que pode ser explicado pela imobilização, manipulação e manutenção dos animais em gaiolas durante longos períodos de tempo. Um estudo experimental realizado no Japão reportou aumento da PIO em animais submetidos à estresse após encarceramento<sup>120,121</sup>.

## 5.2. Avaliação Histo-morfometria

No presente estudo, as alterações histológicas encontradas na conjuntiva dos coelhos tratados, evidenciaram mudanças no padrão celular normal.

A morfometria do epitélio e do estroma conjuntival revelou aumento variável da espessura em todos os grupos experimentais, principalmente no grupo latanoprostá com 30 dias e bimatoprostá com 60 dias. O único estudo semelhante ao nosso, que fez avaliação morfométrica da conjuntiva de coelhos tratados com análogos de prostaglandinas e betabloqueadores, não reportou aumento na espessura epitelial ou na densidade de colágeno subconjuntival nos animais tratados com AP, mas somente nos que receberam timolol por 30 dias<sup>122</sup>. No entanto, outros estudos semelhantes, não morfométricos, descreveram sinais de indiretos de aumento de espessura epitelial<sup>123,124</sup> como edema, metaplasia e hiperplasia celular.

A morfometria também evidenciou uma redução acentuada da espessura epitelial e estromal no grupo latanoprostá com 60 dias, que possivelmente teve relação com as intensas alterações morfológicas encontradas nos animais deste grupo na segunda metade do experimento.

A análise histomorfológica da conjuntiva com 30 dias, mostrou dano epitelial variável, mais evidente nos animais tratados com AP, e de maior intensidade nos grupos bimatoprostá e travoprostá, com a presença de degeneração vacuolar, perda da relação núcleo citoplasma, corpos apoptóticos (picnose, cariólise

---

e cromatólise), perda de células caliciformes, infiltração de células inflamatórias (linfócitos), edema de tecido conjuntivo e neovascularização discreta (grupo travaprostá). No grupo latanoprostá, apesar do aumento de espessura do epitélio, as alterações morfológicas foram discretas nesta fase do experimento, o que poderia ser atribuído à um possível efeito cito protetor desta droga, uma vez que sua concentração de cloreto de benzalcônio (0,02%) é maior que a da travaprostá (0,015%), da bimatoprostá (0,005%) e também da concentração utilizada no grupo conservante (0,005%)<sup>82, 124-127</sup>.

Aos 60 dias observou-se intenso dano celular em todos os grupos tratados com AP, com a presença de metaplasia, que indica reação tecidual à injúria crônica. O grupo latanoprostá apresentou a maior alteração da morfologia típica do tecido conjuntivo, com metaplasia do tipo escamosa e queratinização do epitélio, que pode justificar a redução de espessura<sup>128</sup>.

A perda ou diminuição das células caliciformes foi observada em todos os grupos do presente estudo, sendo relacionada, na literatura, à toxicidade do conservante cloreto de benzalcônio<sup>123,124,128,129</sup>. Estudo recente sobre a relação toxicidade/concentração do cloreto de benzalcônio sobre a superfície ocular, em ratos tratados somente com o conservante, observou decréscimo do número de células caliciformes inversamente proporcional ao aumento da concentração<sup>129</sup>.

No entanto, estudo de Faria et al., reportou aumento de células caliciformes em coelhos tratados com associação de AP e timolol por 30 dias, resultado que foi atribuído à ação dos AP e não do betabloqueador, que conforme resultados de outros estudos prévios, provoca redução na densidade de células caliciformes e da produção de lágrimas<sup>130,131</sup>. Russ et al. também observaram um aumento nas células caliciformes em coelhos tratados com análogos de prostaglandina por 30 dias, que não foi observado naqueles tratados com timolol<sup>122</sup>.

A diferença entre os resultados do presente estudo e os de Faria et al., e Russ et al. com relação as células caliciformes, pode estar relacionada ao tempo de acompanhamento dos animais, visto que os dois estudos acompanharam os animais somente por 30 dias e no nosso experimento a diminuição foi mais intensa com 60 dias. Na literatura a diminuição destas células está relacionada com o uso crônico dos AP<sup>106,123,132</sup>.

---

Notou-se também discreta neovascularização no grupo travoprosta com 30 dias e nos grupos latanoprosta e conservante com 60 dias. Este achado é frequente em processos inflamatórios e já mencionada em outros estudos, podendo estar relacionado a ação direta das prostaglandinas sintéticas, e associada à ação de metaloproteinases que atuam em mediadores inflamatórios que estimulam a neovascularização<sup>133</sup>.

Com relação ao grupo conservante, as alterações morfológicas encontradas no presente estudo, se intensificaram na segunda metade do experimento, com a presença de anaplasia, presente quando há intensa alteração na formação celular, como no caso das neoplasias. Este achado corrobora a hipótese de que o uso crônico dos conservantes pode levar a alterações celulares permanentes<sup>134</sup> e que mesmo em concentrações baixas (0,005%), o conservante pode ser tóxico.

Estudos com linhagens celulares de conjuntiva mostram que a toxicidade de soluções comercialmente disponíveis de latanoprosta, travoprosta e bimatoprosta são principalmente relacionadas às suas concentrações de cloreto de benzalcônio, porém que a interação entre a droga e o conservante pode diminuir o efeito tóxico induzido pelo uso prolongado destas medicações<sup>135,136</sup>.

Nesta mesma linha de pesquisa, estudo de Brasnu et al. mostrou que a solução de latanoprosta, que tem a maior concentração de cloreto de benzalcônio, apresentou os maiores efeitos pró-apoptóticos e pró-oxidativos, comparado com os da travoprosta e da bimatoprosta, que têm concentrações mais baixas. No entanto, com relação à apoptose, induzida pelo conservante isolado, a concentração de 0,005% de cloreto de benzalcônio foi mais tóxica que as demais enquanto a bimatoprosta que contém conservante na mesma concentração, induziu a menor taxa de apoptose<sup>82</sup>. Estes resultados reforçam a ideia de que possa existir outros fatores envolvidos no equilíbrio inflamação/reparação nos tecidos expostos à AP por longos períodos, o que poderia explicar porque os animais do grupo latanoprosta, no início do nosso experimento, apresentaram poucas alterações morfológicas na conjuntiva, apesar da maior concentração de conservante e na fase crônica, com 60 dias de acompanhamento, exibiram as alterações mais intensas.



### 5.3. Avaliação Imuno-histoquímica

A expressão da metaloproteinase 2 no nosso experimento foi mais pronunciada nos primeiros 30 dias, e muito leve, na segunda metade, sendo que no grupo latanoprosta não houve expressão da proteína. Este resultado expressa a característica da MMP-2, que é específica de processos inflamatórios agudos, e uma importante peça no processo de remodelamento tecidual tardio, por regular a ação da MMP-9<sup>135,136</sup>. O grupo conservante também apresentou marcação para a proteína na fase aguda do experimento e baixa expressão no final, mostrando que o conservante também induz reação inflamatória tecidual.

O papel regulatório das metaloproteinases 2 e 9, nos tecidos oculares são amplamente estudados por causa da participação delas na patogênese de diversas doenças, como vasculopatia polipoidal da coróide, retinopatia diabética, ceratocone, melanoma de coróide, síndrome do olho seco e glaucoma<sup>137-141</sup>.

A MMP2 é uma gelatinase, que atua acelerando a migração celular, em especial no momento agudo da regeneração tecidual e que tem ação angiogênica por meio da ativação do TNF- $\alpha$  e do VEGF. Nos processos inflamatórios ela aumenta a permeabilidade do endotélio, contém a evasão de leucócitos para fora do tecido inflamado e atua na atividade regulatória linfocitária<sup>142</sup>. A regulação da sua atividade ocorre pela ação dos inibidores teciduais (TIMP-1 e 2)<sup>135</sup>, havendo uma modulação entre a MMP-2 (de ação mais aguda) e a 9 (de ação mais tardia).

As metaloproteinases e seus inibidores tem sido alvo de estudos que visam identificar o seu papel nos mecanismos de remodelamento da via úveo-escleral de escoamento do humor aquoso, que se relacionam à eficácia dos análogos de prostaglandinas<sup>143</sup>. Outrossim, o desequilíbrio entre as MMPs e os TIMPS pode causar aumento da resistência à drenagem do humor aquoso, por acúmulo de material da matriz extracelular.

Em olhos normais, as MMPs (2, 14, 15 e 16) tem boa expressão na malha trabecular, enquanto que as MMPs (1,3, 9) e os TIMP-2, são expressas em baixos níveis. Já nos pacientes com glaucoma, os níveis de MMP-1 e 3 estão altos enquanto os níveis da MMP-2 e 9 estão bem reduzidos, o que justificaria o aumento da PIO<sup>144</sup>.

Estudo in vitro, com células da malha trabecular humana, mostrou que a latanoprosta parece influenciar a modulação das metaloproteinases presentes no

humor aquoso de pacientes com glaucoma causando a redução da MMP-2 e TIMP-2<sup>145</sup>. Outra pesquisa semelhante investigou o efeito da latanoprostá tópica na expressão de metaloproteinases em células do epitélio conjuntival e concluiu que esta droga aumenta a MMP-1 e 9 e diminui o TIMP-1 neste tecido, o que pode contribuir para o avanço de doenças da superfície ocular<sup>146</sup>.

Os resultados da imuno-histoquímica no grupo latanoprostá, na fase crônica do experimento levantam a questão de que em função da modulação entre as gelatinases, na falta da MMP-2, as alterações encontradas neste estudo podem ter sido causadas pela MMP-9, que se expressa em processos crônicos, sugerindo que a latanoprostá teria um comportamento diferente dos outros AP com relação à expressão das MMPs<sup>135, 147</sup>. Novos estudos são necessários para que se comprove esta hipótese.

Outro resultado do presente estudo, no grupo latanoprostá, que confirma achados de outros estudos da literatura, foi o grande adelgaçamento e espaçamento entre as fibras colágenas estromais<sup>88</sup>.

Os efeitos regulatórios dos análogos de prostaglandinas sobre as ações das metaloproteinases na superfície ocular, tem sido estudado por causa da potencial influência destas proteínas no resultado das cirurgias filtrantes em pacientes com glaucoma. Sabendo-se que a integridade da conjuntiva é uma condição essencial para o sucesso destes procedimentos cirúrgicos, o controle da inflamação diminui o risco de falência pela fibrose induzida.

Estudo de Terai et al, com conjuntivas de pacientes cronicamente tratados com latanoprostá, encontrou diminuição da densidade do colágeno estromal e um infiltrado inflamatório pouco pronunciado. Segundo os autores, a regulação positiva de MMP-1 e MMP-3 pela droga poderia explicar o reduzido acúmulo de matriz extracelular no estroma conjuntival e contribuir para o sucesso da cirurgia de filtração de glaucoma<sup>148</sup>. Mietz et al., observaram que a latanoprostá provocou mudança nas fibras de colágeno, com diminuição de material amorfo e aumento de espaços vazios<sup>88</sup>.

Estudo com amostras de conjuntiva de pacientes com glaucoma submetidos à implantes filtrantes mostrou que o aumento da expressão da MMP-9 na cápsula da vesícula formada após a cirurgia, interfere com a arquitetura mesma, aumentando o escape de líquido pela parede e diminuindo a PIO<sup>133</sup>.

---

#### 5.4. Considerações finais

A utilização crônica de análogos de prostaglandinas como monoterapia no tratamento do glaucoma é uma realidade estabelecida.

O presente estudo identificou alterações histomorfológicas de intensidades variáveis nos grupos tratados com AP e conservante, que se intensificaram com o aumento do tempo de acompanhamento.

A maior da expressão da MMP-2 na fase aguda e a ausência dela na fase crônica do experimento, principalmente no grupo latanoprostá sugere a existência de outros fatores envolvidos no processo de lesão e reparação tecidual induzido pelos AP que ainda precisam ser desvendados.

Uma maior compreensão da interação entre os AP, seus conservantes e das vias pelas quais as MMPs funcionam, possibilitará no futuro identificar estratégias terapêuticas que minimizem os efeitos prejudiciais destas drogas, tão eficazes no controle da PIO.

É importante frisar que por ser um estudo com coelhos, a generalização dos nossos resultados é limitada.

*Conclusões*

---

---

## 6. CONCLUSÕES

No coelho, nas condições experimentais utilizadas e de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Houve aumento de espessura epitelial e estromal na conjuntiva dos animais tratados com análogos de prostaglandinas, principalmente no grupo latanoprost, aos 30 dias, e bimatoprost, com 60 dias de seguimento.
2. Houve reação inflamatória com predominância de linfócitos, diminuição de células caliciformes e alterações morfológicas celulares, como degeneração vacuolar, perda da relação núcleo citoplasma e corpos apoptóticos, principalmente nos grupos bimatoprost e travaprost com 30 dias de experimento,
3. Houve intensa desorganização tecidual em todos os grupos tratados com análogos de prostaglandinas, com a presença de metaplasia escamosa no grupo latanoprost, com 60 dias de experimento.
4. O grupo conservante apresentou pequeno aumento de espessura epitelial e estromal associado com alterações morfológicas leves aos 30 dias e, hiperplasia do epitélio e anaplasia com 60 dias de seguimento.
5. A expressão da MMP2 foi mais pronunciada nos grupos tratados com análogos de prostaglandinas nos primeiros 30 dias.

## *Referências*

---

---

---

## REFERÊNCIAS

1. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Crowston JG, Goldberg I. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2012;40(4):341-49.
2. Cook C, Foster P. Epidemiology of glaucoma: What's new? *Can J Ophthalmol.* 2012; 47:223-26.
3. Foster A, Gilbert C, Johnson G. Changing patterns in global blindness: 1988-2008. *Community Eye Health.* 2008;21(67):37-39.
4. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.*2006;90:262-67.
5. Tham Y, Li X, Wong T Y, Quigley HA, Aung T, Cheng C. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmol.* 2014;121(11):2081-90.
6. Paranhos-Junior A, Omi CA, Prata-Junior JA. Sociedade Brasileira de Glaucoma: III Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. São Paulo: Best Point; 2009.
7. Jonas JB, Aung T, Bourne RR, Bron AM, Ritch R, Panda-Jonas S. Glaucoma. *Lancet.* 2017;390(11):2183-93.
8. Leske MC, Connell AM, Wu SY, Hyman LG, Schachat AP. Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol.*1995;113(7):918-24.
9. Rossetti L, Sacchi M, Karabatsas CH, Topouzis F, Vetrugno M, Centofanti M, et al. Comparison of the effects of bimatoprost and a fixed combination of latanoprost and timolol on 24-hour blood and ocular perfusion pressures: the results of a randomized trial. *BMC Ophthalmol.* 2015;22:15-17.
10. Wentz SM, Kim NJ, Wang J, Amireskandari A, Siesky B, Harris A. Novel therapies for open-angle glaucoma. *F1000Prime Rep.* 2014;4(6):102.

11. Maruyama Y, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshikawa H, Kinoshita S. Comparison between bimatoprost and latanoprost-timolol fixed combination for efficacy and safety after switching patients from latanoprost. *Clin Ophthalmol*. 2015;9:1429-36.
12. Cucherat M, Stalmans I, Rouland JF. Relative efficacy and safety of preservative-free latanoprost (T2345) for the treatment of open-angle glaucoma and ocular hypertension: an adjusted Indirect comparison meta-analysis of randomized clinical trials. *J Glaucoma*. 2014;23(1):e69-75.
13. Lee CW, Buckley F, Costello S, Kelly S. A systematic review of the characteristics of randomized control trials featuring prostaglandins for the treatment of glaucoma. *Curr Med Res Opin*. 2008; 24: 2265–70.
14. Conlon R, Saheb H, Ahmed II . Glaucoma treatment trends: a review. *Can J Ophthalmol*. 2017;52(1):114-124.
15. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The Pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama*. 2014;311(18):1901–11.
16. Gupta SK, Niranjana D G, Agrawal SS, Srivastava S, Saxena R. Recent advances in pharmacotherapy of glaucoma. *Indian J Pharmacol*. 2008;40(5):197-208.
17. Costa VP, Wilson RP, Azuara-Blanco A. Medical Therapy. In: Azuara-Blanco A, Costa VP, Wilson RP. *Handbook of Glaucoma*. London-United Kingdom:2002. p.101-11.
18. Pinheiro GKLO, Araújo Filho I, Araújo Neto I, Rêgo ACM, Azevedo EP et al. Nature as a source of drugs for ophthalmology. *Arq Bras Oftalmol*. 2018;81(5):443-54.
19. Sambhara D, Aref AA. Glaucoma management: relative value and place in therapy of available drug treatments. *Ther Adv Chronic Dis*. 2014; 5(1):30-43.
20. Schmidl D, Schmetterer L, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. Pharmacotherapy of glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015;31 (2):63-77.



- 
21. Li G, Farsiu S, Chiu SJ, Gonzalez P, Lütjen-Drecoll E, Overby DR, et al. Pilocarpine-induced dilation of Schlemm's canal and prevention of lumen collapse at elevated intraocular pressures in living mice visualized by OCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(6):3737-46.
  22. Tombran-Tink J, Barnstable CJ, Shields MB, editors. Mechanisms of the glaucoma- Disease process and therapeutic modalities. Totowa NJ: Humana Press; 2008.
  23. Zimmerman TJ, Dukar U, Nardin GF, Patchett R, Fuqua M. Carbachol dose response. *Am J Ophthalmol.* 1989;108(4):456-57.
  24. Soltau JB, Zimemerman TJ. Changing paradigms in the medical treatment of glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 2002;47(Suppl 1):S2-S5.
  25. Kass MA, Mandell AI, Goldberg I, Paine JM, Becker B. Dipivefrin and epinephrine treatment of elevated intraocular pressure: a comparative study. *Arch Ophthalmol.* 1979;97(10):1865-66.
  26. Toris CB, Gleason ML, Camras CB, Yablonski ME. Effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Arch Ophthalmol.* 1995;113(12):1514-47.
  27. Paterson GD, Paterson G. Drug therapy of glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 1972;56(3):288-94.
  28. Kramer SG. Epinephrine distribution after topical administration to phakic and aphakic eyes. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1980; 78:947-82.
  29. Sugrue MF. The pharmacology of antiglaucoma drugs. *Pharmacol Ther.* 1989;43(1):91-138.
  30. Novack GD, Robin AL. Ocular pharmacology. *J Clin Pharmacol.* 2016;56(5):517-27.
  31. Toris CB. Pharmacotherapies for Glaucoma. *Current Molecular Medicine.* 2010;10:824-40.

32. Realini T. A History of glaucoma pharmacology: review. *Optom Vis Sci* .2011;88(1):36–38.
33. Fiscella RG. Glaucoma medications: a drug-therapy review. *Manag Care*. 2002;27(11 Suppl):25-31.
34. Liebmann JM, Lee JK. Current therapeutic options and treatments in development for the management of primary open-angle glaucoma. *Am J Manag Care*. 2017;23(15 Suppl):S279-S92.
35. Rouland JF. Le traitement médical initial: bêtabloquants ou prostaglandines? *J Fr. Ophtalmol*.2004;27(6):716-7.
36. Doucette LP, Walter MA. Prostaglandins in the eye: Function, expression, and roles in glaucoma. *Ophthalmic Genet*. 2017;38(2):108-16.
37. Impagnatiello F, Bastia E, Almirante N, Brambilla S, Duquesroix B, Kothe AC, et al. Prostaglandin analogues and nitric oxide contribution in the treatment of ocular hypertension and glaucoma. *Br J Pharmacol*. 2018;18.
38. Linden C. Therapeutic potential of prostaglandin analogues in glaucoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(4):679-94.
39. Alexander CL, Miller SJ, Abel SR. Prostaglandin analog treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Ann Pharmacother*. 2002;36(3):504-11.
40. Souza Filho JP, Dias ABT, Lima Filho AA, Sartori MF, Martins MC. A evolução do mercado farmacêutico brasileiro no tratamento do glaucoma nos últimos 30 anos. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 66:811-17.
41. Ritter J, Flower R, Henderson G, Rang H. Rang and Dale's Pharmacology. 8<sup>a</sup> ed. London: Churchill Livingstone; 2016.
42. Camras CB, Siebold EC, Lustgarten JS, Serle JB, Frisch SC, Podos SM, et al. Maintained reduction of intraocular pressure by prostaglandin F2 alpha-1-isopropyl ester applied in multiple doses in ocular hypertensive and glaucoma patients. *Ophthalmol*. 1989; 96:1329-36.

- 
43. Lee AJ, McCluskey P. Clinical utility and differential effects of prostaglandin analogs in the management of raised intraocular pressure and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol.* 2010;30(4):741-64.
  44. Bean GW, Camras CB. Commercially available prostaglandin analogs for the reduction of intraocular pressure: similarities and differences. *Surv Ophthalmol.* 2008;53(Suppl):S69-S84.
  45. Patel SS, Spencer CM. "Latanoprost. A review of its pharmacological properties, clinical efficacy and tolerability in the management of primary open-angle glaucoma and ocular hypertension". *Drugs Aging.* 1996;9(5):363-78.
  46. Hellberg MR, Sallee VL, McLaughlin MA, Sharif NA, Desantis L, Dean TR, et al. Preclinical Efficacy of Travoprost, a Potent and Selective FP Prostaglandin Receptor Agonist. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.* 2001;17(5):421-32.
  47. Boulton LT, Martin EDB, Jackson FM, Lennon IC, McCague R, Parkin N, et al. Synthesis of the Potent Antiglaucoma Agent, Travoprost. *Organic Process Research & Development.* 2002;6(2):138-45.
  48. Eisenberg DL, Toris CB, Camras CB. Bimatoprost and travoprost: a review of recent studies of two new glaucoma drugs. *Surv Ophthalmol.* 2002;47(Suppl 1):S105-15.
  49. Choplin N, Bernstein P, Batoosingh AL, Whitcup SM. A randomized, investigator-masked comparison of diurnal responder rates with bimatoprost and latanoprost in the lowering of intraocular pressure. *Surv Ophthalmol.* 2004;49(Suppl 1):S19-25.
  50. Pubchem Compound [Internet]. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?term=bimatoprost>.
  51. Takagi Y, Nakajima T, Shimazaki A, Kageyama M, Matsugi T, Matsumura Y, et al. Pharmacological characteristics of AFP-168 (tafluprost), a new prostanoid FP receptor agonist, as an ocular hypotensive drug. *Exp Eye Res.* 2004;78(4):767-76.

- 
52. Aihara M. Clinical appraisal of tafluprost in the reduction of elevated intraocular pressure (IOP) in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol*. 2010;24(4):163-70.
  53. Sutton A, Gouws P, Ropo A. Tafluprost, a new potent prostanoid receptor agonist: a dose-response study on pharmacodynamics and tolerability in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Therap*. 2008;46(8):400-06.
  54. Pubchem Compound [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tafluprost>.
  55. Winkler NS, Fautsch MP. Effects of prostaglandin analogues on aqueous humor outflow pathways. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2014;30(2-3):102-09.
  56. Alm A, Nilsson SFE. Uveoscleral outflow: a review. *Exp Eye Res*. 2009;88:760-68.
  57. Schachtschabel U, Lindsey JD, Weinreb RN. The mechanism of action of prostaglandins on uveoscleral flow. *Curr Opin Ophthalmol*. 2000;11:112-15.
  58. Pyott DE. Glaucoma Education Center. [Internet]. Available from: <https://www.aao.org/basic-skills/animation-of-aqueous-flow>.
  59. Oh DJ, Martin JL, Williams AJ, Peck RE, Pokorny C, Russell P, et al. Analysis of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human ciliary body after latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(3):953-63.
  60. Yu AL, Fuchshofer R, Kampik A, Welge-Lüssen U. Effects of oxidative stress in trabecular meshwork cells are reduced by prostaglandins analogues. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):4872-80.
  61. Dubiner HB, Hubatsch DA. Late-day intraocular pressure-lowering efficacy and tolerability of travoprost 0.004% versus bimatoprost 0.01% in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension: a randomized trial. *BMC Ophthalmol*. 2014;28 (14):151-58.

- 
62. Macky TA. Bimatoprost versus travoprost in an Egyptian population: a hospital-based prospective, randomized study. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010; 26(6):605-10.
  63. Abib, F.C. *Terapêutica Farmacológica em Oftalmologia.* 3ª ed., Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005. 318p.
  64. Alm A, Stjernschantz J. Effects on intraocular pressure and side effects of 0.005% latanoprost applied once daily, evening or morning. A comparison with timolol. Scandinavian Latanoprost Study Group. *Ophthalmology.* 1995;102:1743-52.
  65. Wand M, Gaudio AR. Cystoid macular edema associated with ocular hypotensive lipids. *Am J Ophthalmol.* 2002;133:403-05.
  66. Watanabe K, Hayasaka S, Hayasaka Y, Nagaki Y. Cystoid macular edema associated with latanoprost use in a pseudophakic eye with a history of surgical complications. *Jpn J Ophthalmol,* 2003;47:110-12.
  67. Lima MC, Paranhos Jr. A, Salim S, Honkanen R, Devgan L, Wand M. et al. Visually significant cystoid macular edema in pseudophakic and aphakic patients with glaucoma receiving latanoprost. *J Glaucoma.* 2000;9:317-21.
  68. Perry CM, McGavin JK, Culy CR, Ibbotson T. Latanoprost: an update of its use in glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging,* 2003;20:597-630.
  69. Brandt JD, Wittpenn JR, Katz LJ, Steinmann WN, Spaeth GL. Conjunctival impression cytology in patients with glaucoma using long-term topical medication. *Am J Ophthalmol.* 1991;112(3):297-301.
  70. Mannis MJ, Holland EJ. In: *Cornea.* St.Louis: Mosby;1997. Chap.1:41-47.
  71. Sternberg RSS (ed): *Histology for Pathologists,* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:321.
  72. Krieger FT, Schor P. Anatomia e fisiologia. In: Nakanami CR, Zin, A, Belfort R Jr. *Oftalmopediatria,* 1ªed. São Paulo:Roca, 2010: cap.1, 25-6.

- 
73. Chodsh J, Nordquist RE, Kennedy RC. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. *Developmental and Comparative Immunology*. 1998; 22: 621-30b.
  74. Knopa E, Knopb N. Anatomy and Immunology of the Ocular Surface. In: Niederkorn JY, Kaplan HJ. *Immune Response and the Eye*. Chemical Immunology and Allergy. Basel: Karger, 2007, vol 92: 36-49.
  75. Doughty MJ. Functional morphology of mucosal goblet cells based on spatial separation of orifice openings to the surface--application to the rabbit bulbar conjunctiva. *Tissue Cell*. 2014;46:241-48.
  76. Lima, L. Alterações morfológicas da conjuntiva de coelhos submetidos a tratamento com fármacos anti-glaucomatosos tópicos com e sem conservantes. Dissertação de tese de doutorado. 2014, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.106p.
  77. Konstas AG, Boboridis KG, Kapis P, Marinopoulos K, Voudouragkaki IC, Panayiotou D, et al. 24-hour efficacy and ocular surface health with preservative-free tafluprost alone and in conjunction with preservative-free dorzolamide/timolol fixed combination in open-angle glaucoma patients insufficiently controlled with preserved latanoprost monotherapy. *Adv Ther*. 2017;32:221-35.
  78. Hepsen IF, Ozkaya E. 24-h IOP with latanoprost, travoprost, and bimatoprost in subjects with exfoliation syndrome and ocular hypertension. *Eye*. 2007;21(4):453-8.
  79. Lemij HG, Hoevenaars JGMM, van der Windt C, Baudouin C. Patient satisfaction with glaucoma therapy: reality or myth? *Clin Ophthalmol*.2015;9:785–93.
  80. Zimmerman TJ, Hahn SR, Gelb L, Tan H, Kim EE. The impact of ocular adverse effects in patients treated with topical prostaglandin analogs: changes in prescription patterns and patient persistence. *J Ocul Pharmacol Ther*.2009;25(2):145-52.

81. Paula JS, Furtado JM, Santos AS, Coelho RM, Rocha EM, Rodrigues MLV. Risk factors for blindness in patients with open-angle glaucoma followed-up for at least 15 years. *Arq Bras Oftalmol.* 2012;75(4):243-6.
82. Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Guenoun JM, Baudouin C. In vitro effects of preservative-free tafluprost and preserved latanoprost, travoprost, and bimatoprost in a conjunctival epithelial cell line. *Curr Eye Res.* 2008; 33:303-12.
83. Kim EJ, Kim YE, Kang SH, Lee KW, Park YJ. In vitro of preservative-free and preserved prostaglandin analogs on primary cultured human conjunctival fibroblast cells. *Korean J Ophthalmol.* 2013;27(6):446-453.
84. Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol.* 2008; 86:716-26.
85. Demirel S, Doganay S, Gurses I, Iraz M. Toxic-inflammatory effects of prostoglandin analogs on the ocular surface. *Ocul Immunol Inflamm.* 2013;21(1):13-18.
86. Miki T, Naito T, Fujiwara M, Araki R, Kiyoi R, Shiode Y, et al. Effects of pre-surgical administration of prostaglandin analogs on the outcome of trabeculectomy. *PLoS One.* 2017;12(7): e0181550.
87. Russ HH, Nogueira-Filho PA, Barros JN, Faria NV, Montiani-Ferreira F, Gomes JA, et al. Ocular surface evaluation in patients treated with a fixed combination of prostaglandin analogues with 0.5% timolol maleate topical monotherapy: a randomized clinical trial. *Clinics.* 2013;68(10):1318-24.
88. Mietz H, Schlotzer-Schrehardt U, Strassfeld C, Gu"nter KK. Effect of Latanoprost and Timolol on the Histopathology of the Rabbit Conjunctiva. *IOVS.* 2001;42(3):679-87.
89. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.

- 
90. Sahay P, Rao A, Padhy D, Sarada S, Gopinath D, Reddy MM et al. Functional activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in tears of patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58: BIO106–BIO113.
  91. Yamada H, Yoneda M, Gosho M, Kato T, Zako M. Bimatoprost, latanoprost, and tafluprost induce differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases. *BMC Ophthalmology.* 2016;16(26):1-6.
  92. Määttä M, Tervahartiala T, Harju M, Airaksinen J, Autio-Harmainen H, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma, exfoliation syndrome, and exfoliation glaucoma. *J Glaucoma.* 2005;14(1):64-9.
  93. Todd LA, Lindsey JD, Weinreb RN. Latanoprost's effects on timp-1 and timp-2 expression in human ciliary muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3705-11.
  94. Sivak JM, Fini, ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2002;21:1-14.
  95. Liu Y, Liu Y, Xu DJ, Li J. Latanoprost-induced cytokine and chemokine release from human tenon's capsule fibroblasts: role of mapk and nf-kb signaling pathways. *J Glaucoma.* 2015;24:635-41.
  96. Liu Y, Ko J, Yanai R, Kimura K, Chikama T, Sagara T, et al. Induction by latanoprost of collagen gel contraction mediated by human tenon fibroblasts: Role of Intracellular Signaling Molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(4):1429-36.
  97. Helin-Toiviainen M, Ronkko S, Puustjarvi T. Conjunctival matrix metalloproteinases and their inhibitors in glaucoma patients. *Acta Ophthalmol.* 2015;93:165-17.
  98. Sakata R, Sakisaka T, Matsuo H, Miyata K, Aihara M. Time course of prostaglandin analog-related conjunctival hyperemia and the effect of a nonsteroidal anti-inflammatory ophthalmic solution. *J Glaucoma.* 2016;25(3):e204-e08.



- 
99. Stewart WC, Stewart JA, Nelson LA. Ocular surface disease in patients with ocular hypertension and glaucoma. *Current Eye Research*. 2011;36(5):391-98.
  100. Tsai JH, Derby E, Holland EJ, Khatana AK. Incidence and prevalence of glaucoma in severe ocular surface disease. *Cornea*. 2006;25(5):530-32.
  101. Noecker R, Miller KV. Benzalkonium chloride in glaucoma medications. *Ocul Surf*. 2011;9(3):159-62.
  102. Actis AG, Rolle T. Ocular surface alterations and topical antiglaucomatous therapy: a review. *Open Ophthalmol J*. 2014;8:67-72.
  103. Yanagi M, Kiuchi Y, Yuasa Y, Yoneda T, Sumi T, Hoshikawa Y, et al. Association between glaucoma eye drops and hyperemia. *Jpn J Ophthalmol*. 2016;60(2):72-7.
  104. Parrish RK, Palmberg P, Sheu WP. A Comparison of Latanoprost, Bimatoprost, and Travoprost in patients with elevated intraocular pressure: A 12-week, randomized, masked-evaluator multicenter study. *Am J Ophthalmol* 2003;135:688-703.
  105. Trzeciecka A, Paterno JJ, Toropainen E, Koskela A, Podracka L, Korhonen E, et al. Long-term topical application of preservative-free prostaglandin analogues evokes macrophage infiltration in the ocular adnexa. *Eur J Pharmacol*. 2016;5(788):12-20.
  106. Liang H, Brignole-Baudouin F, Pauly A, Riancho L, Baudouin C. Polyquad-preserved travoprost/timolol, benzalkonium chloride (bak)-preserved travoprost/timolol, and latanoprost/timolol in fixed combinations: a rabbit ocular surface study. *Adv Ther*. 2011;28(4):311-25.
  107. Liang H, Brignole-Baudouin F, Rabinovich-Guilatt L, Mao Z, Riancho L, Faure MO, et al. Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions: an in vivo study in rabbits. *Mol Vis*. 2008;31(14):204-16.
  108. Kass MA, Podos SM, Moses RA, Becker B. Prostaglandin e 1 and aqueous humor dynamics. *Invest ophthalmol*. 1972;11:1022-27.

- 
109. Arcieri ES, Santana A, Rocha FN, Guapo GL, Costa VP. Blood aqueous barrier changes after the use of prostaglandin analogues in patients with pseudophakia and aphakia: a 6-month randomized trial. *Arch Ophthalmol*. 2005;123:186-92.
  110. Abelson MB, Mroz M, Rosner SA, Dirks MS, Hirabayashi D. Multicenter, open-label evaluation of hyperemia associated with use of bimatoprost in adults with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Adv Ther*. 2003;20:1-13.
  111. Stewart WC, Kolker AE, Stewart JA, Leech J, Jackson AL. Conjunctival hyperemia in healthy subjects after short-term dosing with latanoprost, bimatoprost, and travoprost. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:314-20.
  112. Feldman RM. Conjunctival hyperemia and the use of topical prostaglandins in glaucoma and ocular hypertension. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2003;19:23-35.
  113. Chew PT, Aung T, Aquino MV, Rojanapongpun P; EXACT Study Group. Intraocular pressure-reducing effects and safety of latanoprost versus timolol in patients with chronic angle-closure glaucoma. *Ophthalmology*. 2004;111:427-34.
  114. Gandolfi S, Simmons ST, Sturm R, Chen K, Vanderburgh AM. Three-month comparison of bimatoprost and latanoprost in patients with glaucoma and ocular hypertension. *Adv Ther*. 2001;18:110-121.
  115. Quinones R, Severin T, Mundorf T. Efficacy of bimatoprost 0.03 percent in untreated glaucoma and ocular hypertension patients: results from a large community-based clinical trial. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2004;20:115-22.
  116. Cantor LB, Wu Dunn D, Cortes A, Hoop J, Knotts S. Ocular hypotensive efficacy of bimatoprost 0.03% and travoprost 0.004% in patients with glaucoma or ocular hypertension. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(suppl 1):12-18.
  117. Astin M, Stjernschantz J, Selén G. Role of nitric oxide in PGF<sub>2</sub> alpha-induced ocular hyperemia. *Exp Eye Res*. 1994;59(4):401-7.
  118. Astin M, Stjernschantz J. Mediation of prostaglandin f<sub>2</sub> alpha-induced ocular surface hyperemia by sensory nerves in rabbits. *Curr Eye Res*. 1997;16(9):886-90.

- 
119. Honrubia F, Garcia-Sanchez J, Polo V, de la Casa JM, Soto J. Conjunctival hyperaemia with the use of latanoprost versus other prostaglandin analogues in patients with ocular hypertension or glaucoma: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:316–21.
  120. Miyazaki Y, Matsuo T, Kurubayashi. Immobilization stress induces elevation of intraocular pressure rabbits. *Ophthalmic Res*.2000;32:270-77.
  121. Miyazaki Y. Stress raises intraocular pressure in rabbits. *J Okayama Medical Association*. 1999;111(3-8):95-104.
  122. Russ HH, Nogueira-Filho PA, Barros JN, Faria NV, Montiani-Ferreira F, Gomes JA, et al. Ocular surface evaluation in patients treated with a fixed combination of prostaglandin analogues with 0.5% timolol maleate topical monotherapy: a randomized clinical trial. *Clinics*. 2013;68(10):1318-24.
  123. Demirel S, Doganay S, Gurses I, Iraz M. Toxic–Inflammatory Effects of Prostaglandin Analogs on the Ocular Surface, Ocular Immunology and Inflammation.2013; 21(1):13-18.
  124. Lee HJ, Jun RM, Cho MS, Choi KR. Comparison of the ocular surface changes following the use of two different prostaglandin F2 $\alpha$  analogues containing benzalkonium chloride or polyquad in rabbit eyes. *Cutan Ocul Toxicol*. 2015;34(3):195-202.
  125. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:4594–99.
  126. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole- Baudouin F. In vitro study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, travoprost, and bimatoprost in conjunctivaderived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2444–50.
  127. Yu F, Liu X, Zhong Y, Guo X, Li M, Mao Z, et al. Sodium hyaluronate decreases ocular surface toxicity induced by benzalkonium chloride–preserved latanoprost: an in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* .2013;54(5):3385-93.

- 
128. Kim EJ, Kim YH, Kang SH, Lee KW, Park YJ. In vitro effects of preservative-free and preserved prostaglandin analogs on primary cultured human conjunctival fibroblast cells. *Korean J Ophthalmol.* 2013;27(6):446-53.
  129. Yang Q, Zhang Y, Liu X, Wang N, Song Z, Wu K. A Comparison of the Effects of Benzalkonium Chloride on Ocular Surfaces between C57BL/6 and BALB/c Mice. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):E509.
  130. de Faria NV, Russ HH, Rose P, Noronha L, Mello PA, Montiani-Ferreira F, et al. Conjunctival changes and inflammatory aspects in rabbits' conjunctivas induced by fixed combinations of prostaglandin analogues and timolol maleate. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2013;3(22):1-7.
  131. Shimazaki J, Hanada K, Yagi Y, Yamagami J, Ishioka M, Shimmura S, et al. Changes in ocular surface caused by antiglaucoma eyedrops: prospective, randomized study for the comparison of 0.5% timolol v. 0.12% unoprostone. *Brit J Ophthalmol.* 2000;84(11):1250–54.
  132. Rodrigues MLV, Crosta DPSF, Soares CP, Deghaide NHS, Duarte R, Sakamoto FS, et al. Immunohistochemical expression of HLA-DR in the conjunctiva of patients under topical prostaglandin analogs treatment. *J Glaucoma.* 2009;18(3):197-200.
  133. Välimäki J, Uusitalo H. Matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-9, and TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3) and markers for vascularization in functioning and non-functioning bleb capsules of glaucoma drainage implants. *Acta Ophthalmol.* 2015; 93(5):450-56.
  134. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):312-34.
  135. Caley MP, Martins VLC, O'Toole EA. Metalloproteinases and wound healing. *Advances in wound care.* 2015;4(4):225-34.
  136. Löffek S, Schilling O, Franzke. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J.* 2011; 38:191-208.

- 
137. Wu KY, Wu PC, Lai YH, Hong SJ. Novel usage of intraocular pressure-lowering drugs as wounds-healing inhibitors after trabeculotomy with cell culture and animal models. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2013;29(7): 353-61.
  138. Lüke J, Vukoja V, Brandenbusch T, Nassar K, Rohrbach JM, Grisanti S, Lüke M, Tura A. CD147 and matrix-metalloproteinase-2 expression in metastatic and non-metastatic uveal melanomas. *BMC Ophthalmol*. 2016;16:74.
  139. Smith VA, Matthews FJ, Majid MA, Cook SD. Keratoconus: matrix metalloproteinase-2 activation and TIMP modulation. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(4):431-39.
  140. Shen G, Ma X. High levels of 17 $\beta$ -estradiol are associated with increased matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activity in tears of postmenopausal women with dry eye. *J Ophthalmol*. 2016; 2016:2415867.
  141. Guo MS, Wu YY, Liang ZB. Hyaluronic acid increases MMP-2 and MMP-9 expressions in cultured trabecular meshwork cells from patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis*. 2012;18:1175-81.
  142. Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(1):34-41.
  143. Yamada H, Yoneda M, Goshio M, Kato T, Zako M. Bimatoprost, latanoprost, and tafluprost induce differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases. *BMC Ophthalmol*. 2016;8:16-26.
  144. Keller KE, Aga M, Bradley JM, Kelley MJ, Acott TS. Extracellular matrix turnover and outflow resistance. *Exp Eye Res*. 2009;88(4):676-82.
  145. Oh DJ, Martin JL, Williams AJ, Russell P, Birk DE, et al. Effect of latanoprost on the expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(9):3887-95.
  146. Honda N, Miyai T, Nejima R, Miyata K, Mimura T, Usui T et al. Effect of latanoprost on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 on the ocular surface. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(4):466-71.


- 
147. Burton MJ, Bailey RL, Jeffries D, Rajak SN, Adegbola RA, Sillah A, et al. Conjunctival Expression of Matrix Metalloproteinase and Proinflammatory Cytokine Genes after Trichiasis Surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(7):3583-90.
  148. Terai N, Schlötzer-Schrehardt U, Lampel J, Böhm AG, Rummelt C, Schmidt E et al. Effect of latanoprost and timolol on the histopathology of the human conjunctiva. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(2):219-24.

*Anexos*

---

## ANEXOS

## Anexo A - Parecer da Comissão de Ética no uso de animais da FMB – UNESP.

**unesp**  **Universidade Estadual Paulista**  
**Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone: (14) 3880-1608/3880-1609  
e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br  
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 16 de setembro de 2016

OF. 28/2016-CEP

Fls.	31
Proc.	3564 / 2016
Rub.	P

Ilustríssima Senhora  
Profa. Dra. Eliane Chaves Jorge  
Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e CCP da  
Faculdade de Medicina de Botucatu  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Prezada Profa. Eliana,

Em relação ao Projeto: **(Protocolo CEUA 744-2009)** "Ação de prostaglandinas tópicas nas metaloproteinases e ciclooxigenases do epitélio ciliar e conjuntiva de coelhos", aprovado por esta CEUA em 28/05/2008, informo que foi **AUTORIZADA** a mudança de orientação, que inicialmente era da Profa. Dra. Maria Rosa Bet Moraes Silva, haja vista a aposentadoria da referida docente.

Por motivos particulares o projeto teve uma pausa em 2011, já após a coleta do material, e será reiniciado para posterior conclusão nesse semestre, sem coleta de novos materiais. Sendo assim foi prorrogado o prazo para apresentação de Relatório Final de Atividades e o título também foi modificado por motivo de tempo de estocagem do material.

O projeto ficou assim constituído:

**EQUIPE DE PESQUISA**

**Autor:** Evian Valli de Aguiar

**Orientador:** Profa. Dra. Eliane Chaves Jorge

**TÍTULO**

**Novo título:** "Ação de prostaglandinas tópicas na conjuntiva de coelhos"

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros  
Presidente da CEUA



**Anexo B** - Medidas da Pressão intraocular (PIO) dos olhos dos coelhos tratados com AP e solução conservante.

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Momentos</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Bimatoprosta 0,03%	7	0	12	12,5
Bimatoprosta 0,03%	9	0	12	13,5
Bimatoprosta 0,03%	19	0	12,5	15,5
Bimatoprosta 0,03%	22	0	10	11,5
Bimatoprosta 0,03%	36	0	9,5	10,5
Bimatoprosta 0,03%	37	0	8	10
Bimatoprosta 0,03%	7	15	12	13,5
Bimatoprosta 0,03%	9	15	11,5	15
Bimatoprosta 0,03%	19	15	15,5	17
Bimatoprosta 0,03%	22	15	11,5	13
Bimatoprosta 0,03%	36	15	9,5	12
Bimatoprosta 0,03%	37	15	9	10
Bimatoprosta 0,03%	7	30	18	21,5
Bimatoprosta 0,03%	9	30	14,5	16,5
Bimatoprosta 0,03%	19	30	11	14
Bimatoprosta 0,03%	22	30	10	11,5
Bimatoprosta 0,03%	36	30	9,5	12,5
Bimatoprosta 0,03%	37	30	12,5	20,5

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Momentos</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Travoprosta 0,004%	3	0	9,5	12,5
Travoprosta 0,004%	5	0	11,5	13
Travoprosta 0,004%	11	0	10	11,5
Travoprosta 0,004%	33	0	8,5	9,5
Travoprosta 0,004%	35	0	12	12,5
Travoprosta 0,004%	39	0	12	13
Travoprosta 0,004%	3	15	9	13,5
Travoprosta 0,004%	5	15	13,5	14,5
Travoprosta 0,004%	11	15	10	11,5
Travoprosta 0,004%	33	15	11,5	12,5
Travoprosta 0,004%	35	15	11,5	13
Travoprosta 0,004%	39	15	10,5	12,5
Travoprosta 0,004%	3	30	8,5	11,5
Travoprosta 0,004%	5	30	16,5	19,5
Travoprosta 0,004%	11	30	13	16,5
Travoprosta 0,004%	33	30	11,5	11,5
Travoprosta 0,004%	35	30	11,5	11,5
Travoprosta 0,004%	39	30	12,5	17,5

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>momento</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Latanoprostá 0,005%	2	0	12,5	13,5
Latanoprostá 0,005%	12	0	10	11,5
Latanoprostá 0,005%	14	0	11,5	12
Latanoprostá 0,005%	15	0	9	9,5
Latanoprostá 0,005%	28	0	12	12,5
Latanoprostá 0,005%	31	0	9,5	10
Latanoprostá 0,005%	2	15	9,5	13
Latanoprostá 0,005%	12	15	11	12,5
Latanoprostá 0,005%	14	15	13	15,5
Latanoprostá 0,005%	15	15	14	14,5
Latanoprostá 0,005%	28	15	6	12
Latanoprostá 0,005%	31	15	11,5	12,5
Latanoprostá 0,005%	2	30	11,5	14,5
Latanoprostá 0,005%	12	30	11	12,5
Latanoprostá 0,005%	14	30	16	19
Latanoprostá 0,005%	15	30	13,5	14,5
Latanoprostá 0,005%	28	30	11	15
Latanoprostá 0,005%	31	30	12,5	14,5

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Momento</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Placebo	27	0	12	12,5
Placebo	40	0	13,5	16,5
Placebo	27	15	13	13,5
Placebo	40	15	12,5	13,5
Placebo	27	30	9	12,5
Placebo	40	30	13,5	16,5

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Momento</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Bimatoprosta 0,03%	17	45	11,5	13,5
Bimatoprosta 0,03%	18	45	12,5	13,5
Bimatoprosta 0,03%	20	45	16	19
Bimatoprosta 0,03%	25	45	12,5	17
Bimatoprosta 0,03%	29	45	12	16
Bimatoprosta 0,03%	17	60	14,5	15,5
Bimatoprosta 0,03%	18	60	13	14,5
Bimatoprosta 0,03%	20	60	15	16,5
Bimatoprosta 0,03%	25	60	14	16,5
Bimatoprosta 0,03%	29	60	14	19

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Momento</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Travoprosta 0,004%	4	45	16	17
Travoprosta 0,004%	8	45	13,5	15,5
Travoprosta 0,004%	10	45	14	17,5
Travoprosta 0,004%	16	45	14,5	15
Travoprosta 0,004%	30	45	10,5	15
Travoprosta 0,004%	34	45	12	15
Travoprosta 0,004%	4	60	15	16
Travoprosta 0,004%	8	60	12,5	14
Travoprosta 0,004%	10	60	14,5	16,5
Travoprosta 0,004%	16	60	12	18,5
Travoprosta 0,004%	30	60	12	13
Travoprosta 0,004%	34	60	15	17,5

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Momento</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Latanoprost 0,005%	6	45	14,5	15
Latanoprost 0,005%	13	45	11,5	12,5
Latanoprost 0,005%	21	45	10	16,5
Latanoprost 0,005%	23	45	12,5	15,5
Latanoprost 0,005%	24	45	12,5	15
Latanoprost 0,005%	26	45	11,5	14,5
Latanoprost 0,005%	6	60	16	22
Latanoprost 0,005%	13	60	15,5	19
Latanoprost 0,005%	21	60	12,5	15,5
Latanoprost 0,005%	23	60	10,5	11,5
Latanoprost 0,005%	24	60	14	14,5
Latanoprost 0,005%	26	60	10,5	14,5

<b>Grupo</b>	<b>Coelho</b>	<b>Momento</b>	<b>OD</b>	<b>OE</b>
Placebo	1	45	14	16
Placebo	32	45	12,5	15,5
Placebo	1	60	9	16
Placebo	32	60	13	13,5