

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**DURAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E EXPRESSÃO DE
DIFERENTES METALOPROTEINASES, DO COLÁGENO
TIPO IV E DA INTERLEUCINA-10, EM CÓRNEAS DE
COELHOS TRATADAS COM MORFINA, APÓS
CERATECTOMIA LAMELAR**

Alexandre Pinto Ribeiro
Médico Veterinário

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DURAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E EXPRESSÃO DE
DIFERENTES METALOPROTEINASES, DO COLÁGENO
TIPO IV E DA INTERLEUCINA-10, EM CÓRNEAS DE
COELHOS TRATADOS COM MORFINA, APÓS
CERATECTOMIA LAMELAR**

Alexandre Pinto Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

**Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp para obtenção do
título de Doutor em Cirurgia Veterinária –
área de concentração Cirurgia Veterinária**

Jaboticabal – SP

Dezembro de 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Alexandre Pinto Ribeiro – nascido em 27 de dezembro de 1973. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Santa Catarina em julho de 2002. Durante o período de graduação foi bolsista do Programa de Iniciação Científica do CNPq durante dois anos (2000 - 2002). Foi Residente (área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais) da Universidade Luterana do Brasil, no período de setembro de 2002 à setembro de 2003. Posteriormente, atuou como médico veterinário autônomo até junho de 2005. Obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária pela FCAV/UNESP em julho de 2007. Engressou no Curso de Doutorado em Cirurgia Veterinária da mesma instituição em agosto de 2007. Integrante do corpo clínico e cirúrgico do ambulatório de oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” de setembro de 2005 à novembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar saúde, permitindo com que eu possa ir em busca de meus ideais.

À minha mãe, Vera, pela sua dedicação excepcional aos filhos e principalmente, por ser mãe e pai ao mesmo tempo.

Ao meu pai, Fernando, por sempre me apoiar em tudo o que faço e por me incentivar a continuar fazendo.

À minha querida namorada Tathiana, pelo amor, dedicação, carinho, alegria, bom humor, amizade e compreensão... Você é meu porto seguro - Te amo muito!!!

A todos os meus avós, Afra, Zézus e Manoela, aos meus irmãos Dani, Gui, Fernandinho e Vitor pelo apoio, confiança e incentivo. Amo todos vocês.

Ao professor Laus, por me receber e abrir as portas não só da pós-graduação, mas também no serviço de oftalmologia desta universidade que tanto sonhei fazer parte. Também pelos ensinamentos, tanto os profissionais quanto os pessoais.

À todas as pessoas que compuseram e compõem a minha casa, vocês são minha segunda família: André (Linguíça), Andrezão, Zaine, Viçosa, Miguel, Márcio, Pedro Paulo, Marcus (Psico), Luis, Beto, Diogo, Evandro, Daniel (Cardio Bozo), Tiago, Cida e aos que já se mudaram...

À minha segunda república: Mari, Sofia e Leandro pela a amizade.

Aos colaboradores dessa pesquisa: Miguel, Beto, Rodrigo, Danilo, Tiago e Márcio pelo auxílio “braçal” e científico.

Ao Tiago e a Fernanda por acomodarem em sua casa, abrirem as portas do laboratório de imunologia da UFU e por me auxiliarem na realização do *ELISA*.

Ao professor Alexandre (Baixo) pelo auxílio prestado nas primeiras imunoquímicas...

Ao professor Valadão pelo contato com a Cristália...

À Cristália por manipular as soluções de morfina.

À professora Tereza Cristina por abrir as portas do laboratório de virologia da Unesp de Araçatuba para realização da imunoquímica e por fornecer toda a logística necessária.

Ao Rodrigo pela padronização da técnica de imunoquímica.

Aos colegas da oftalmologia que pela amizade e auxílio me ajudaram nessa jornada: Ana Letícia, Bianca, Juan Pablo, Fabrício, Fábio Brito, Denise, Miguel, Luciano, Paty, Ivan, Roberta, Keythe e Dunia.

E a FAPESP pela bolsa e o auxílio financeiro concedido para realização dessa pesquisa

Sem vocês meu sonho não teria se realizado!

Muito obrigado!!

DEDICO,

Ao grande amigo Marcelo, que sempre me incentivou em minha carreira acadêmica... Esteja onde você estiver. Fique com Deus!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1 Inervação corneal.....	16
1.2 Dor corneal.....	16
1.3 Reparação cicatricial da córnea.....	18
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODO.....	24
3.1 Aspectos Éticos.....	24
3.2 Animais.....	24
3.3 Indução das úlceras.....	25
3.4 Solução de morfina.....	26
3.5 Grupos experimentais.....	26
3.6 Avaliação clínica.....	28
3.6.1 Tempo de epitelização.....	28
3.6.2 Estesiometria.....	29
3.7 Histologia.....	30
3.8 Imunoistoquímica.....	31
3.9 Zimografia.....	32
3.10 Imunoensaio ligado à enzima (<i>ELISA</i>).....	33
3.11 Avaliação estatística.....	34
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Avaliação clínica.....	35
4.1.1 Tempo de epitelização.....	35
4.1.2 Estesiometria.....	38
4.2 Histologia.....	44
4.3 Imunoistoquímica.....	47
4.4 Zimografia.....	59
4.5 Imunoensaio ligado à enzima (<i>ELISA</i>).....	63
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

Metaloproteinase da matriz extracelular.....	MMP
Limiar de sensibilidade corneal.....	LSC
Grupo Morfina.....	GM
Grupo Controle.....	GC
Imunoensaio enzimático ligado à enzima.....	ELISA
Interleucina-10.....	IL-10
Hematoxilina e Eosina.....	H.E.
4'6'-diamidino-2-fenilindol.....	DAPI
Nanomolar.....	nM
Solução de fosfato tampão detergente.....	PBS-T
Gramas/milímetro ²	g/mm ²
Olho direito.....	Olho direito
Olho esquerdo.....	Olho esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da imunomarcção por índice semi-quantitativo.....	32
Tabela 2. Estatística descritiva dos grupos controle e morfina, dos valores relativos ao tempo de epitelização (dias), em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2009.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagem fotográfica ilustrando dissecação do estroma, com auxílio de lâmina de bisturi 69 angulada em 60 graus (seta vasada) e pinça colibri (seta) em olho esquerdo de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2010.....	26
Figura 2.	Fluoroxograma relativo aos procedimentos e avaliações realizadas no primeiro e no segundo experimento, nos grupos controle (GC) e morfina (GM). Jaboticabal, 2010.....	28
Figura 3.	Quantificação da área ulcerada com <i>software</i> específico, em olho direito de coelho macho adulto da raça Nova Zelândia Branco. A área ulcerada em verde foi circundada (seta branca) com auxílio da ferramenta <i>free hand selections</i> e quantificada numericamente (seta preta). Jaboticabal, 2010.....	29
Figura 4.	Imagem fotográfica ilustrando avaliação do limiar de sensibilidade corneal basal, com estesiômetro de Cochet Bonett, em coelho macho, adulto da raça Nova Zelândia Branco. Notar filamento de náilon em contato a córnea (seta preta) e estesiômetro (seta branca). Jaboticabal, 2010.....	30
Figura 5.	Valores relativos ao percentual da área ulcerada circundada, nos grupos controle e morfina, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	36
Figura 6.	Valores relativos ao limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), nos grupos controle e morfina, antes (Basal) e após a instilação de 50 μL de sulfato de morfina, na córnea de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2010.....	38
Figura 7.	Valores relativos ao limiar de sensibilidade corneal entre os olhos direito e esquerdo (g/mm^2), nos grupos controle e morfina, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, antes (basal) e decorridas 6, 11, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	40
Figura 8.	Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM). Observar, ao primeiro dia, polimorfos nucleares na superfície estromal da região ulcerada (setas vasadas), assim como na região subepitelial (setas). Ao sexto dia, observa-se monocamada de células epiteliais (setas). Ao décimo segundo dia, observa-se estratificação do epitélio e reorganização das lamelas estromais, na superfície da área ulcerada. Jaboticabal, 2010.....	45
Figura 9.	Valores relativos ao índice quantitativo atribuído ao infiltrado	

	inflamatório, nos grupos controle e morfina, em córneas coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	46
Figura 10.	Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-1 (MMP-1), 1 e 3 dias após as ceratectomias. Observar expressão da MMP-1 na superfície estromal da região ulcerada (setas brancas) e na região subepitelial adjacente ao leito ulcerado (setas amarelas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010.....	48
Figura 11.	Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-1 (MMP-1), 6, 9, e 12 dias após as ceratectomias na superfície estromal (setas brancas) e no epitélio corneal (setas amarelas). Ao 12º dia, ainda observa-se a expressão da MMP-1, na região subepitelial (setas brancas) e no epitélio corneal (setas amarelas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010.....	49
Figura 12.	Valores atribuídos ao índice semi-quantitativo de imunomarcação da metaloproteinase-1, nos grupos controle e morfina, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	50
Figura 13.	Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9), 1 e 3 dias após as ceratectomias. Observar expressão da MMP-9 na superfície estromal da região ulcerada (setas brancas) e na região subepitelial adjacente ao leito ulcerado (setas amarelas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010. (Barra = 20µm).....	51
Figura 14.	Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9), 6, 9, e 12 dias após as ceratectomias. Observar ao sexto dia após as ceratectomias, expressão da MMP-9 na superfície estromal (setas brancas) no epitélio (setas amarelas). Ao décimo segundo dia, ainda observa-se a expressão da MMP-9, na região subepitelial (setas brancas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010.....	52
Figura 15.	Valores atribuídos ao índice semi-quantitativo de imunomarcação da metaloproteinase-9 (MMP-9), na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	53

Figura 16.	Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, do grupo controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão do colágeno IV, 1 e 3 dias após as ceratectomias. No primeiro dia, nota-se imunomarcção do colágeno IV na região subepitelial (setas amarelas), assim como na membrana de Descemet (setas verdes); não há imunomarcção na região ulcerada (seta brancas). Ao terceiro dia, observa-se expressão do colágeno IV em região de membrana basal (setas amarelas) e adentrando o leito ulcerado (setas brancas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal,2010.....	55
Figura 17.	Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça NovaZelândia Branca, do grupo controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão do colágeno IV, 6, 9 e 12 dias, após as ceratectomias. Ao sexto dia, nota-se imunomarcção descontínua do colágeno IV sob epitélio recém formado (setas). Doze dias após as ceratectomias, observa-se expressão intensa do colágeno IV, em região de membrana basal (setas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010.....	57
Figura 18.	Valores atribuídos ao índice semi-quantitativo de imunomarcção, nos grupos controle e morfina, quanto colágeno tipo IV, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	58
Figura 19.	Tecidos corneais saudáveis de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, incubados com os anticorpos anti-metaloproteinase-1 (MMP-1), anti-metaloproteinase-9 (MMP-9) e anti-colágeno tipo IV. Observar ausência de marcação da MMP-1 e da MMP-9. Expressão focal e descontínua do colágeno do tipo IV, na mebrana basal (setas brancas) e na membrana de Descemet (setas amarelas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010.....	58
Figura 20.	Gel de poliacrilamida enriquecido com gelatina demonstrando bandas de metaloproteinases (MMP) ativas e inativas, na córnea de coelhos machos adultos saudáveis (S), do grupo controle (C) e do grupo morfina (M), decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	59
Figura 21.	Concentração de MMP-2 latente, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, nos grupos controle e morfina, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1,3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal,2010.....	60
Figura 22.	Concentração de MMP-2 ativa, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, nos grupos controle e morfina, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1,3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar.	

	Jaboticabal,2010.....	61
Figura 23.	Concentração de MMP-9 latente, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, nos grupos controle e morfina, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1,3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	61
Figura 24.	Concentração de MMP-9 ativa, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, nos grupos controle e morfina, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1,3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	62
Figura 25.	Concentração de interleucina-10 (IL-10) (nanograma de IL-10/micrograma de tecido), na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, nos grupos controle e morfina, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.....	64

DURAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E EXPRESSÃO DE DIFERENTES METALOPROTEINASES, DO COLÁGENO TIPO IV, DA INTERLEUCINA-10, EM CÓRNEAS DE COELHOS TRATADOS COM MORFINA, APÓS CERATECTOMIA LAMELAR.

RESUMO – Estudaram-se os efeitos da morfina 1% sobre a reparação corneal, avaliando-se a expressão das metaloproteinases-1, -2, -9, do colágeno tipo IV e da interleucina 10 (IL-10), em coelhos submetidos à ceratectomia lamelar. Dois experimentos foram concebidos, empregando-se 56 animais. No primeiro, 6 coelhos foram tratados com 50µl de morfina 1% (GM), a cada 4 horas, totalizando 4 aplicações diárias. Outros 6 coelhos receberam solução fisiológica (GC) nas mesmas condições adotadas para o GM. Após as ceratectomias, as córneas foram avaliadas até sua epitelização. No segundo, 40 animais foram empregados e as córneas colhidas decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias das ceratectomias para histologia, imunoistoquímica (MMP-1, MMP-9 e colágeno tipo IV), zimografia (MMP-2 e MMP-9) e ELISA (IL-10). Mais 4 coelhos saudáveis foram utilizados para como controle negativo. O tempo médio de reepitelização não diferiu entre os grupos. Após a ceratectomia, observou-se elevação significativa quanto ao limiar de sensibilidade corneal da 6^a até 96^a hora da avaliação. Não se observaram alterações histológicas e quanto ao índice de imunomarcação da MMP-1, -9 e do colágeno do tipo IV entre os grupos estudados. À zimografia, níveis mais elevados de MMP-2 e de MMP-9 foram observados no GM, ao 6^o e ao 9^o dias após as ceratectomias. Observou-se decréscimo das formas latente e ativa da MMP-9 ao 12^o dia. Observou-se, ao 1^o dia de avaliação, redução nos níveis de IL-10, comparativamente às córneas saudáveis, mas sem significância estatística entre os grupos, em qualquer dos períodos estudados. O uso local de morfina 1% promoveu analgesia corneal de 4 dias em coelhos submetidos à ceratectomia lamelar e não retardou a epitelização. Elevação do quantitativo da metaloproteinase-1, -2 e -9, em córneas tratadas com morfina 1%, não contraindica seu uso, uma vez que os níveis teciduais dessas enzimas e da IL-10 tenderam a se normalizar ao final do estudo. A expressão do colágeno IV na membrana basal de ambos os grupos, reforça a afirmativa de que, com critério, a morfina 1%, sem preservativo, possa ser utilizada após ceratectomia lamelar.

Palavras chave: coelho, córnea, opióide, reparação tecidual, dor, inflamação

DURATION OF ANALGESIA AND EXPRESSION OF DIFFERENT MATRIX METALLOPROTEINASES, TYPE IV COLLAGEN AND INTERLEUKIN-10 IN RABBITS TREATED WITH MORPHINE , AFTER LAMELLAR KERATECTOMY

ABSTRACT – This study aimed evaluate the effects of continual topical administration of 1% morphine on corneal analgesia in rabbits subjected to lamellar keratectomy until completion of the corneal wound healing and to assess the expression of matrix metalloproteinases (MMPs)-1, -2 and -9, type IV collagen and interleukin-10 (IL-10) during the treatment. Fifty-six animals were used. In the first experiment, 12 rabbits were divided into two groups, one (n=6) received 50 µl of topical 1% morphine (MG) every 4 hours while the other group (n=6) received 0.9% NaCl instead (CG). After keratectomies, corneas were evaluated until healing. In the second experiment, 40 animals were divided, 4 rabbits of each group were euthanized 1, 3, 6, 9, and 12 days after keratectomy and corneal samples were processed for histology, immunohistochemistry (MMP-1, -9 and IV collagen), zymography (MMP-2 and -9) and ELISA (IL-10). Other 4 healthy rabbits were used as negative control. In healthy corneas, CTT did not differ significantly before and after morphine instillation. Mean corneal reepithelization rate did not differ between groups. Following keratectomy, CTT increased from the 6h to 96h time points. Scores of leukocyte infiltration, MMP-1, MMP-9 and type IV collagen expression did not differ between groups at any time point. Zymography indicated that levels of the active forms of MMP-2 and MMP-9 increased on days 6 and 9 in the MG. The levels of both latent and active forms of MMP-9, as well as of the latent form of MMP-2 decreased to values close to those of healthy corneas on day 12. IL-10 levels measured on days 1 to 6 were reduced as compared to those of healthy corneal tissue and returned to levels close to those of healthy corneas. Topical application of 1% morphine promoted corneal analgesia for up to 4 days and did not delay corneal reepithelization. The reestablishment of normal MMP levels, the presence of IL-10 levels close to baseline values at the end of the study and the expression of type IV collagen at the basement membrane in both groups reinforce that, with caution, 1% morphine can be used after lamellar keratectomy in rabbits.

Key words: rabbit, cornea, opioids, corneal wound healing, pain, inflammation

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Inervação corneal

A córnea constitui-se em um dos tecidos mais inervados do organismo. Sua organização consiste, primariamente, de axônios nociceptivos eferentes (MARFURT et al., 2001; BENTLEY & MURPHY, 2004). Ela é provinda dos nervos ciliares longos, uma divisão do nervo trigêmeo (SAMUELSON, 1999). Estima-se que um único neurônio sensitivo possua, em média, de 2000 a 3000 terminações nervosas (MÜLLER et al., 2003). Em coelhos e em gatos, 10 a 15% de toda inervação corneal é simpática, advinda do gânglio cervical superior (MÜLLER et al., 2003). Estudos sugerem que as fibras axonais dos neurônios corneais são funcionalmente heterogêneas, e que, apenas, 20% deles respondam a forças mecânicas (BELMONTE et al., 2004).

Algumas fibras nociceptores polimodais pertencem ao grupo de fibras pobremente mielinizadas. A maioria delas é do tipo C. Nociceptores polimodais respondem a estímulos com descarga contínua e irregular de impulsos, que persistirão enquanto eles forem mantidos. A sua ativação é diretamente proporcional à intensidade do estímulo (BELMONTE et al., 2004). Impulsos elétricos gerados por nociceptores polimodais, não apenas sinalizam para a presença de um estímulo doloroso, mas codificam a sua intensidade e duração (BELMONTE et al., 2004).

1.2 Dor corneal

Ceratites ulcerativas acometem o homem e animais e podem ser de causa traumática, infecciosa, imunomediadas ou por ação direta de agentes químicos, além de outras (ALBERTI et al., 2001; MURPHY et al., 2001; LEDBETTER et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2010).

Ceratites ulcerativas são enfermidades que ensejam desconforto, conquanto a inervação nociceptora da córnea é de superfície, abrange o terço superior do estroma e a camada basal do epitélio corneal (MÜLLER et al., 2003). A dor associada com as ulcerações corneais é de difícil controle (STILES et al., 2003). Aproximadamente, 70% das fibras sensoriais da córnea são de origem polimodal, sendo sensibilizáveis pelo calor, irritantes externos e por mediadores químicos endógenos, como prótons, íons de potássio, prostaglandinas e outros

metabólitos do ácido aracdônico, citocinas, aminas e fatores de crescimento (BELMONTE et al., 2004).

O controle, por fármacos, da dor corneal pode ser direto ou indireto. Quando indireto, visa a acelerar a reparação, diminuindo o tempo de exposição das terminações nervosas (STILES et al., 2003). Diretamente, a dor corneal pode ser amenizada pela instilação de substâncias antiinflamatórias ou de opióides (PEYMAN et al., 1994; STILLES et al., 2003; BELMONTE et al., 2004).

Úlceras indolentes ou defeitos córneo-epiteliais espontâneos crônicos são afecções corneais comuns em cães, que, não raro, obrigam ao desbridamento e à ceratotomias (WHITLEY & GILGER, 1999; MURPHY et al., 2001; LEDBETTER et al., 2006). Pacientes acometidos por defeitos córneo-epiteliais espontâneos crônicos frequentemente manifestam sinais de dor, que perduram por semanas ou meses (STILES et al. 2003; LEDBETTER et al., 2006).

Como opção para o controle da dor em abrasões corneais, preconiza-se a aplicação tópica de antiinflamatórios não esteróides (AINES), que promovem algum grau de analgesia (ALBERTI et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2010). Não obstante, AINES utilizados como analgésicos nas ceratites ulcerativas são epiteliotóxicos, podendo retardar a reparação e potencializar a degradação do estroma corneal (LIN et al., 2000; GUIDERA et al., 2001; HENDRIX et al., 2001; REVIGLIO et al., 2003a; CONCEIÇÃO et al., 2010). Não se indicam anestésicos, porquanto eles são epiteliotóxicos (PEYMAN et al., 1994; MOREIRA et al., 1999).

Há décadas, os opióides são utilizados parenteralmente, como analgésicos. Eles se ligam a receptores endógenos, induzindo a efeitos anti-nociceptivos no sistema nervoso central. Dados sugerem que a aplicação tópica de opióides pode suscitar analgesia local, por via neuroimune, devido à existência de receptores opióides em tecidos periféricos (STEIN et al., 1988; STEIN et al., 1989; WENK & HONDA, 1999; STILES et al., 2003; WENK et al., 2003). Eles são encontrados em pequenas quantidades em tecidos saudáveis. Para que sua síntese se intensifique, injúrias periféricas e inflamação subsequente devem estar presentes (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003). Células do sistema imune contidas em tecidos inflamados podem liberar peptídeos opióides endógenos, interagindo com os receptores e produzindo analgesia (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003).

Pesquisas têm focado o uso de opióides tópicos para o controle da dor em úlceras cutâneas de causas diversas, notadamente a morfina, dada à baixa incidência de efeitos colaterais (ASHFIELD, 2005; ZEPPELETTA et al., 2005; ALAVI-NAINI, 2008). Quando administrada topicamente em úlceras cutâneas extensas, a morfina e os seus metabólitos (morfina-6-glucoronida e a morfina-3-glucoronida) não foram detectados no plasma (RIBEIRO et al., 2004).

Aquino et al. (2005) reportaram que a instilação oftálmica de nalbufina, um opióide agonista kappa /antagonista mu foi capaz de aumentar o limiar de tolerância, quanto à sensibilidade corneal, em cães saudáveis. Peyman et al. (1994) demonstraram que a instilação oftálmica de sulfato de morfina produziu analgesia em córneas ulceradas de homem (PEYMAN et al., 1994). Relatou-se efeito analgésico com a instilação de sulfato de morfina em ratos (WENK et al., 2003) e em cães (STILES et al., 2003) acometidos por úlceras de córnea induzidas experimentalmente, sem que se observassem alterações sobre a reparação cicatricial (PEYMAN et al., 1994; STILES et al., 2003). O mesmo foi constatado no homem, com o uso local de morfina 1% durante o pós-operatório de cirurgia refrativa (FAKTOROVICH & BASBAUM, 2010). Estudos demonstram, todavia, que a morfina atua como substância analgésica, apenas na pele e em córneas ulceradas e inflamadas (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003; WENK et al., 2006).

Adjunto ao efeito analgésico, Wenk et al. (2003) demonstraram que a morfina foi capaz de atenuar a inflamação, quando instilada em córneas ulceradas de ratos. Observou-se que a aplicação parenteral de morfina foi eficaz em reduzir a expressão cutânea da interleucina-1 beta, da interleucina-6, do fator de necrose tumoral-alfa, assim como a infiltração local de neutrófilos (CLARK et al., 2007). Estudos conduzidos no homem e em primatas mostraram que opióides suprimem a quimiotaxia e a migração de neutrófilos (LIU et al., 1992; CHOI et al., 1999). Reconhece-se, ainda, que eles interferem com a imunidade adaptativa (PRUETT et al., 1992).

1.3 Reparação cicatricial da córnea

A reparação cicatricial da córnea é complexa. Ela envolve a ação conjunta de elementos, como a proliferação e a migração centrípeta do epitélio, aliadas a fatores químicos preexistentes na matriz extracelular do estroma, a força

mecânica exercida pelos movimentos palpebrais (BENTLEY & MURPHY, 2003), a viabilidade da sua membrana basal (BENTLEY et al., 2001) e a do filme pré-corneal (BROOKS & OLLIVER, 2004).

Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são alvo de investigações nos âmbitos da oftalmologia médica (SMITH et al., 2001; DANIELS et al., 2003; LEONARDI et al., 2003; REVIGLIO et al., 2003a e b; SAKIMOTO et al., 2003; MULHOLLAND et al., 2005) e da veterinária (STRUBBE et al., 2000; OLLIVER et al., 2007; BOVELAND et al., 2010). MMPs são proteases endógenas pertencentes a uma família de enzimas dependentes de zinco e de cálcio, essenciais à manutenção de processos homeostáticos. Elas estão envolvidas na remodelação e na reparação, bem como na destruição de tecidos, inclusive o corneal (SIVAK & FINI, 2002; BROOKS & OLLIVER, 2004).

Elas em quatro classes de enzimas: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromalisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e as com especificidade para membranas celulares (MMP-14, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) (SIVAK & FINI, 2002; BROOKS & OLLIVER, 2004). As metaloproteinases da matrix extracelular (MMP) são proteases endógenas pertencentes a uma família de enzimas dependentes de zinco e de cálcio, essenciais à manutenção de processos homeostáticos. Elas estão envolvidas na remodelação e na reparação, bem como na destruição de tecidos, inclusive os corneais (SIVAK & FINI, 2002; BROOKS & OLLIVER, 2004).

Em córneas doentes, após a sinalização de diferentes citocinas, MMPs perdem peso molecular e se tornam ativas. Elas degradam a matrix extracelular, proteínas celulares de superfície, citocinas, inibidores teciduais de outras proteases, além de sinalizarem a ativação de proteases latentes (SIVAK & FINI, 2002; BROOKS & OLLIVER, 2004). A manutenção e o reparo da matrix extracelular da córnea requerem um equilíbrio, entre a síntese de componentes da matrix extracelular e sua degradação e remodelação. Algumas MMPs, notadamente a MMP-2, são encontradas em sua forma latente, em córneas saudáveis, sendo responsável pela remodelação fisiológica da matriz corneal (OLLIVIER et al., 2007). Inibidores teciduais de enzimas líticas, como o inibidor de protease alfa-1, a alfa-2 macroglobulina e inibidores teciduais de metaloproteinases são encontrados no tecido corneal saudável e na lágrima (OLLIVIER et al., 2007). Quando inibidores teciduais específicos em degradar

enzimas líticas, não vencem a síntese e a ativação de diferentes MMPs, a instalação de distúrbios patológicos como a ceratomalácia são observados (BROOKS & OLLIVER, 2004; OLLIVIER et al., 2007).

Reportou-se maior atividade da MMP-1 em células epiteliais e da MMP-9 na remodelação do estroma corneal, após ceratectomias lamelares em coelhos (MULHOLLAND et al., 2005). Em cães e em eqüinos, a remodelação corneal do estroma é, com maior ênfase, realizada pela MMP-2, sintetizada por ceratócitos. Outrossim, ela participa da remodelação fisiológica do estroma corneal, ativando-se na presença de moléculas de colágeno danificadas (OLLIVIER et al., 2007). A MMP-9 é produzida por células epiteliais e por neutrófilos (OLLIVIER et al., 2007). Lin et al. (2008) comprovaram que, após a injeção de lipopolissacarídeos na córnea, a MMP-8 promove a digestão do colágeno estromal por produzir tripeptídeos quimiotáticos e pela migração de neutrófilos na fase exudativa.

Córneas em processo de reparação cicatricial tornam-se vascularizadas, pela ativação da MMP específica para membranas celulares, que destrói fatores anti-angiogênicos (angiostatina e endostatina) e promove a síntese do fator de crescimento do endotélio vascular (AZAR, 2006).

Após injúrias neuronais, a MMP-9 corrobora para a instalação da dor neuropática precoce, pela liberação de interleucina-1 beta e por ativação microglial. A MMP-2 mantém a dor neuropática tardia, por liberação de interleucina-1 beta e pela ativação de astrócitos. A inibição destas enzimas foi capaz de controlar a dor neuropática experimental em ratos (KAWASAKI et al., 2008).

Nas ceratites ulcerativas, a atividade proteolítica está elevada, decrescendo proporcionalmente com a evolução da reparação tecidual. A concentração tecidual de metaloproteinases mantém-se elevada em casos de ceratomalácia (OLLIVIER et al., 2007). Observou-se que metaloproteinases podem permanecer ativas por vários anos em córneas de homem submetidos a cirurgias refrativas “LASIK” (FOURNIÉ et al., 2008).

Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), utilizados em ceratites ulcerativas, podem retardar a reparação e potencializar a degradação do estroma corneal (HENDRIX et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2010). Demonstrou-se elevação, quanto à expressão de diferentes metaloproteinases, na córnea de

ratos após a instilação oftálmica de diclofenaco sódico e de cetorolaco de trometamina, sem conservante (REVIGLIO et al., 2003b). Observou-se maior expressão de MMPs no grupo que recebeu diclofenaco sódico, comparativamente ao tratado com cetorolaco sem preservativo (REVIGLIO et al., 2003b). Mesmo desprovidas de preservativos, soluções oftálmicas compostas por AINES exercem efeitos danosos ao epitélio corneal (CONCEIÇÃO et al., 2010).

Além das MMPs, proteínas de superfície celular estão envolvidas na reparação corneal. O colágeno é a mais abundante nos vertebrados e considerado o principal componente da matriz extracelular. Já se descreveram 26 tipos de colágeno em vertebrados. O estroma corneal é rico em colágeno tipo I, mas mantém grande quantitativo do tipo V. O colágeno do tipo III apresenta-se em pequenas quantidades no estroma, sendo mais sintetizado, em estados patológicos (MICHELACCI, 2003). Na membrana basal de cães, coelhos e de homem, o colágeno tipo IV é o predominante (BENTLEY et al., 2001; MICHELACCI, 2003; STERN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2008). Estruturalmente, o colágeno do tipo IV é composto por três cadeias alfa, que se enrolam entre si, em uma conformação helicóide tripla. Três cadeias são reconhecidas, cadeia alfa-1 (IV) e alfa-2 (IV), que se distribuem na proporção de 2:1 e a cadeia alfa-5. Admite-se que os epítomos da cadeia alfa-1, se mascaram entre a membrana basal da córnea, se expressando em maior quantidade no epitélio límbico (LI et al., 2001).

O colágeno tipo IV promove, *in vitro*, adesão e migração de diferentes fenótipos celulares, inclusive os do epitélio corneal (CAMERON et al., 1991). Sua abundância na córnea, em reparação, favorece a regeneração das estruturas lamelares (GAO et al., 2004) e sua fração alfa-5, está envolvida na transparência corneal (CHO et al., 1990; MICHELACCI, 2003; WILLIAMS et al., 2008).

Sob condições normais, o colágeno tipo IV é encontrado na membrana basal do epitélio corneal, no epitélio perilímbico, no epitélio conjuntival, no epitélio ciliar, no músculo ciliar, na malha trabecular do ângulo irido-corneal e, no homem e em coelhos, na membrana de Descemet (STERN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2008).

Em cães, o colágeno tipo IV relaciona-se à adesão da membrana basal ao epitélio corneal, estando ausente em animais com defeitos córneo-epiteliais espontâneos crônicos (BENTLEY et al., 2001). Estudos ratificaram a importante participação desta proteína na reparação de córneas lesadas (GAO et al., 2004; McDERMOTT & WHEATER, 2006; STERN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2008).

A mais bem estudada e conhecida citocina antiinflamatória e homeostática é a interleucina-10 (IL-10). Ela é produzida por macrófagos e por células dendríticas e está envolvida no controle da reação imune inata (ABBAS & LITCHTMAN, 2005). A IL-10 inibe a função dos macrófagos e de outras células do sistema imune, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa, as interleucinas-1, -6, -8, -12 e o interferon-alfa, reduzindo de forma significativa a resposta inflamatória inicial (ABBAS & LITCHTMAN, 2005). Admite-se que sua expressão encontra-se elevada em córneas em reparação, onde o controle da inflamação é mais eficaz (CAO et al., 2002; CRUZ et al., 2007; OH et al., 2008).

Um peptídeo opióide endógeno ([Met⁵] - encefalina), também denominado Fator de Crescimento Opióide, está envolvido na regulação do crescimento epitelial da córnea em coelhos (ZAGON et al., 1998) e na de homem (ZAGON et al., 2000). Este neuropeptídeo e o seu receptor também são expressos na córnea de cães, de gatos e de cavalos (ROBERTSON & ANDREW, 2003). Ele se liga a receptores zeta, inibindo a síntese de DNA e a migração celular. Quando em excesso, todavia, sua ação resulta em desorganização tecidual (ZAGON et al., 1998).

No homem, a epitelização corneal é prejudicada pela interrupção de impulsos nervosos. A substância P é um neuropeptídeo presente em larga escala em nervos corneais. Quando utilizada isoladamente ou em combinação com outros compostos citoativos, a substância P acelera a migração e a proliferação do epitélio corneal, sendo capaz de estimular a síntese de DNA em concentrações picomolares (MURPHY et al., 2001).

Em cães e no homem, a substância P acelerou a epitelização de úlceras indolentes (BROWN et al., 1997; NISHIDA et al., 1997; MURPHY et al., 2001; LEE et al., 2002). Reconhecem-se os efeitos inibitórios da morfina sob a liberação de substância P a partir de terminações nervosas sensitivas (YASKH et al., 1980, BRODIN et al., 2008). Reportou-se que o uso tópico de morfina

retarda a cicatrização de úlceras cutâneas em ratos, pela inibição periférica de substância P e de neurocicina-1 e -2, localizadas em células cutâneas parenquimatosas e em células inflamatórias (ROOK et al., 2007; 2009).

A instilação de naltrexona, um antagonista não específico de receptores opióides, acelerou a reepitelização corneal em coelhos (ZAGON et al., 1998), no homem (ZAGON et al., 2000) e em ratos diabéticos, por inibição do Fator de Crescimento Opióide (ZAGON et al., 2002). Há quem admita que a morfina, um agonista puro de receptores opióides, induza a algum efeito deletério sobre a reparação da córnea, a despeito do seu efeito analgésico (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003).

Estudo conduzido em camundongos demonstrou que o uso tópico de morfina retarda a reparação cutânea, por diminuir a migração de leucócitos e o controle da infecção local (MARTIN et al., 2010). Outra pesquisa reportou que o uso tópico de morfina retarda a cicatrização de úlceras cutâneas em ratos, pela inibição periférica de substância P e de neurocinina (ROOK & McCARSON, 2007). O mesmo grupo de pesquisadores observou que o agente diminui a expressão de receptores de neurocicina-1 e -2, em células cutâneas parenquimatosas e inflamatórias (ROOK et al., 2009).

Na literatura encontra-se um reduzido quantitativo de trabalhos, em que se avaliaram eventos relativos à reparação corneal em olhos aviltados, tratados com morfina. Em um deles, Peyman et al. (1994) estudaram coelhos e homem e valeram-se, apenas, da avaliação clínica; Stiles et al. (2003) acrescentaram a histotologia, e o fizeram em olhos de cães. Ademais, tais estudos, não se avaliaram os efeitos antinociceptivos da morfina até que ocorresse epitelização completa das córneas (PEYMAN et al., 2003; STILES et al., 2003; WENK et al., 2003). Em um único estudo realizado em coelhos, não se avaliaram os efeitos analgésicos da morfina após ceratectomias lamelares (PEYMAN et al., 2004). Recentemente, Faktorovich & Basbaum (2010), descreveram no homem que, após cirurgias refrativas, o uso local de morfina 0,5% reduziu em 50%, o consumo de analgésico oral. Nesse estudo, significância estatística nos escores de dor, foram reportados decorridos 24 horas do final do procedimento (FAKTOROVICH & BASBAUM, 2010).

Métodos de avaliação, referentes à degradação e à reparação da córnea e quanto ao perfil das MMPs, foram conduzidos no âmbito da oftalmologia

veterinária (STRUBBE et al., 2000; OLLIVER et al., 2007; BOVELAND et al., 2010) e na médica (SMITH et al., 2001; DANIELS et al., 2003; LEONARDI et al., 2003; REVIGLIO et al., 2003a; REVIGLIO et al., 2003b; SAKIMOTO et al., 2003; MULHOLLAND et al., 2005). Adjunto, quanto à expressão do colágeno tipo IV (McDERMOTT & WHEATER, 2006; STERN et al., 2006, WILLIAMS et al., 2008) e da IL-10 (CAO et al., 2002; CRUZ et al., 2007; OH et al., 2008).

Como são controversos os dados e as opiniões, relativamente aos efeitos da morfina sobre a reparação tecidual, idealizou-se a pesquisa cujos resultados são apresentados.

2. OBJETIVOS

Investigar os efeitos locais da morfina 1%, sobre a expressão das MMP-1, -2, -9, do colágeno IV e da IL-10, em córneas de coelhos submetidas à ceratectomia lamelar. Outrossim, estudou-se a duração dos possíveis efeitos analgésicos do fármaco, até a reepitelização das córneas.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Aspectos Éticos

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas internacionais da *Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (National Institutes of Health Publications N° 85-23: Revised 1985)*, de consoante com o código de NÜREMBERG (GOLDIN, 1995). Outrossim, sob a expressa autorização da Comissão de Ética e Bem Estar Animal (COBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 19284-07).

3.2 Animais

Cinquenta e seis leporinos (*Oryctolagus cuniculus*; Linnaeus 1758), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos, com peso médio de 3 kg¹ compuseram o total de animais utilizados em dois experimentos.

Para a sua admissão na pesquisa, eles foram clínica e oftalmicamente avaliados, empregando-se o Teste da lágrima de Shirmer², a biomicroscopia

¹ Coelho Nova Zelândia Adulto – Chácara União, Taquaritinga, SP.

com lâmpada em fenda³, a tonometria de aplanção⁴, a oftalmoscopia binocular indireta⁵, e a fluoresceína⁶. Uma vez selecionados, eles foram individualmente mantidos em ambiente ventilado, em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, com dieta à base de ração comercial e água potável “*ad libitum*”.

3.3 Indução das úlceras

Após indução da anestesia, por injeção intramuscular de 15 mg/kg de cetamina S+⁷ associada a 0,5 mg/kg de midazolam⁸ (BORKOWISKI & KARAS, 1999), realizou-se tricotomia periorcular. Posteriormente, instilou-se de uma gota de proximetacaína⁹ e procedeu-se à antissepsia da córnea, do saco conjuntival e da conjuntiva com iodo-polivinil-pirrolidona diluído em solução fisiológica (1:50). A anestesia foi mantida empregando-se máscara com sevoflurano¹⁰, diluído em oxigênio a 100%, em circuito aberto. Os olhos foram centralizados com fio mononáilon 6-0, por meio de suturas esclero-conjuntivais¹¹.

Realizou-se ceratectomia lamelar axial, em ambos os olhos, empregando-se trépano de 200 µm¹² de profundidade, por 6 mm de diâmetro, bisturi 3,2 mms¹³ e tesoura de ceratectomia (Figura 1). Todas as intervenções foram realizadas pelo mesmo cirurgião, sob magnificação de 20X em microscópio cirúrgico¹⁴.

² Teste da Lágrima de Schirmer – Ophthalmos Ltda.

³ XL-1 Slitlamp® – Shin-Nippon, Japão.

⁴ TonoPen XL®, Medtronic

⁵ Oftalmoscópio binocular indireto FOH-5® – Eyetec S.A.

⁶ Fluoresceína strips® – Ophthalmos Ltda.

⁷ Cetamin S+® - Cristália, São Carlos, São Paulo.

⁸ Dormire® - Cristália, São Carlos, São Paulo

⁹ Anestalcon®, Alcon, São Paulo, Brasil.

¹⁰ Sevurane® - Cristália, São Carlos, São Paulo.

¹¹ Ethicon® - Jhonson & Jhonson, São Paulo.

¹² Trépano Milimetrado (6.0 mm) – Steel Inox, Campinas, Brasil.

¹³ Bisturi 3,2mm 60°, SIS, Ohio, USA.

¹⁴ MC-M902®, DF Vasconcelos, São Paulo, SP.

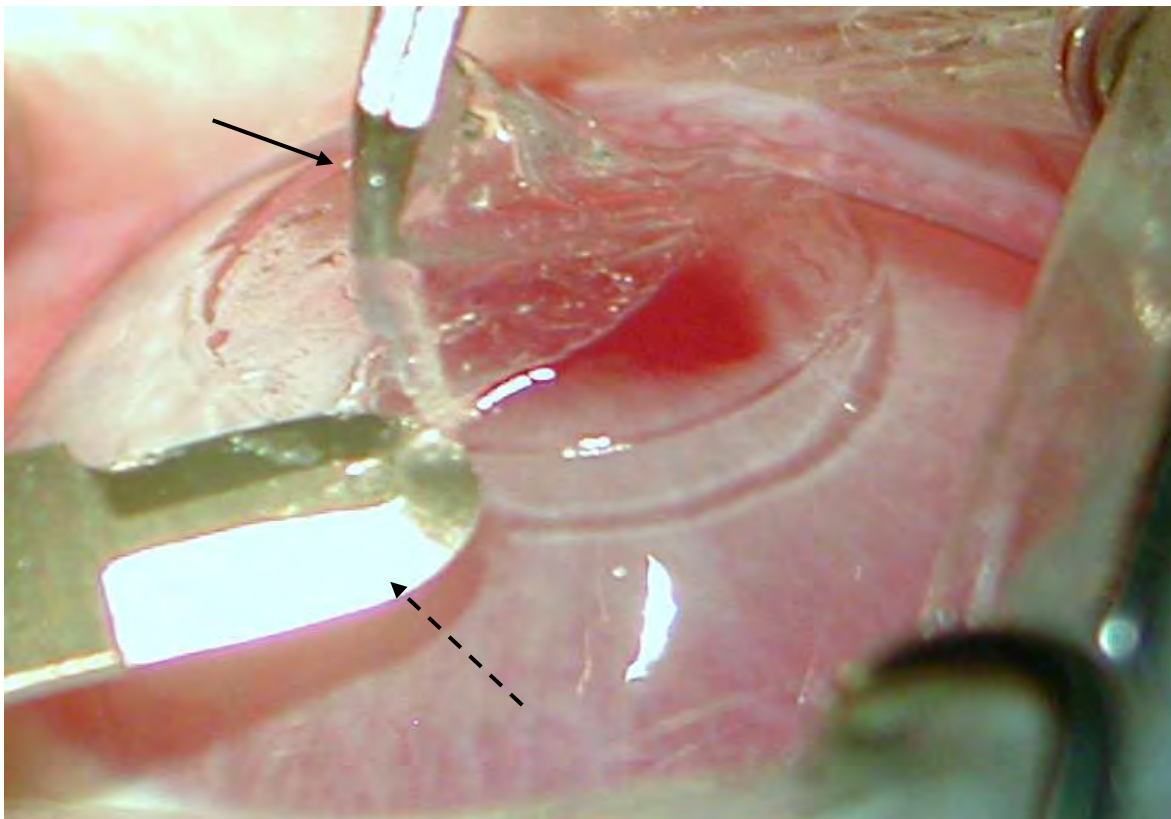


Figura 1: Imagem fotográfica ilustrando dissecação do estroma, com auxílio de lâmina de bisturi 69 angulada em 60 graus (seta vasada) e pinça colibri (seta) em olho esquerdo de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2010.

3.4 Solução de morfina

Soluções oftálmicas de sulfato de morfina a 1%, sem conservante, foram manipuladas industrialmente por fabricante autorizado¹⁵. O pH foi ajustado em 6,0, pela adição de ácido clorídrico, para se evitar a precipitação do sal, e de hidróxido de sódio. As soluções foram estocadas por até três dias à temperatura de 4°C e protegidas da luz. Peyman et al. (1994) reportaram que soluções de morfina diluídas e estocas sob tais condições permanecem estáveis por mais de um mês.

3.5 Grupos experimentais

Dos 56 coelhos selecionados, 12 foram utilizados em um primeiro experimento, onde se avaliaram o tempo de epitelização e a sensibilidade corneal. Formaram-se o grupo morfina (GM, n=6) e o grupo controle (GC, n=6).

¹⁵Solução oftálmica experimental de sulfato de morfina a 1% sem preservativo (lote: 736/08), Cristália, Campinas, SP.

No GM, instilou-se 50µl de solução de morfina 1% em ambos os olhos, às 8, 12, 16 e 20 horas. No GC, instilou-se 50µl de solução fisiológica 0,9%, bilateralmente, nos mesmos horários estabelecidos para o GM. Em ambos os grupos, os tratamentos tiveram início dois dias antes da cirurgia (período de aclimação e colheita de valores basais) e seis horas após a ceratectomia lamelar.

Para profilaxia da infecção, empregou-se colírio de tobramicina a 0,3%¹⁶, 10 minutos após a instilação de morfina ou da solução fisiológica 0,9%, nos mesmos horários pré-estabelecidos.

Em um segundo experimento, 44 coelhos foram utilizados e decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias das ceratectomias, 4 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia e as córneas dos olhos direito foram acondicionadas em meio para criopreservação¹⁷, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80° C, para posterior preparação e avaliação à histologia de rotina (H.E.) e à imunoistoquímica (MMP-1, MMP-9 e colágeno tipo IV). As córneas dos olhos esquerdos foram mantidas à -80° C, para avaliação à zimografia (MMP-2 e MMP-9) e imunoensaio enzimático ligado à enzima (IL-10). Com o intuito de estabelecer valores basais, outros 4 coelhos saudáveis foram submetidos à eutanásia e suas córneas foram colhidas e submetidas aos mesmas avaliações descritas acima. O fluxograma abaixo sumariza a sequência adotada, relativamente aos procedimentos e as avaliações realizados no primeiro e no segundo experimento (Figura 2).

¹⁶Tobrex, Alcon®, São Paulo, SP

¹⁷Tissue-Tek OCT® Compound –Sakura, The Netherlands

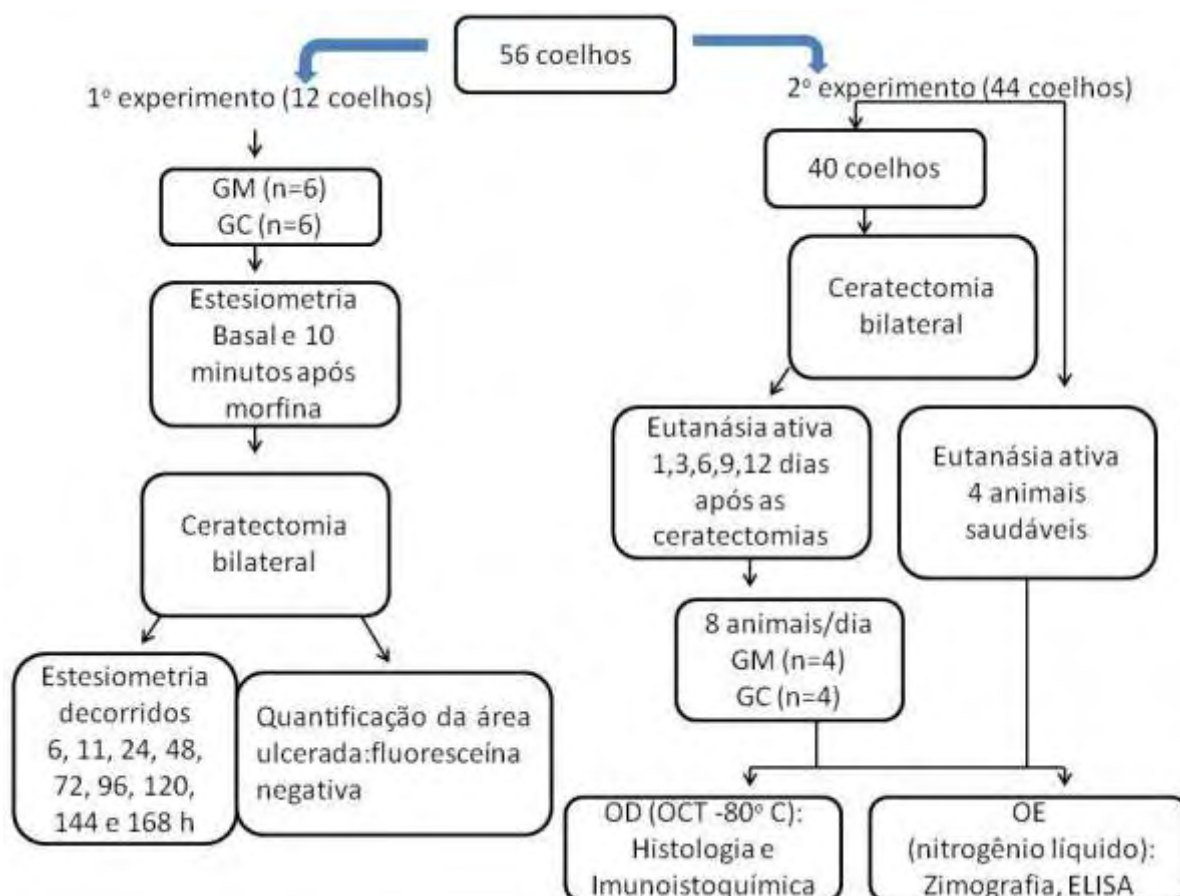


Figura 2. Fluxograma relativo aos procedimentos e avaliações realizadas no primeiro e no segundo experimento, nos grupos controle (GC) e morfina (GM). Jaboticabal, 2020.

3.6 Avaliação clínica

3.6.1 Tempo de epitelação

As córneas operadas foram avaliadas à biomicroscopia com luz em fenda³ e filtro azul cobalto, após instilação de fluoresceína⁴, sempre às 14 horas de cada dia, pelo mesmo observador, desde a concepção das úlceras, até a sua epitelação (fluoresceína negativa). Para monitoramento da evolução, quanto à epitelação, os olhos dos pacientes foram fotografados¹⁸, com filtro azul cobalto, sem auxílio de flash, a uma distância fixa de 4cm. As imagens fotográficas foram avaliadas em *software* específico¹⁹ para quantificação da área ulcerada (STERN et al., 2006; KIM et al., 2009).

¹⁸Cybershot 7.1® Sony do Brasil, São Paulo, SP, Brasil

¹⁹Image J, disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Após a seleção das imagens (ferramenta *File/Open...*), a área ulcerada foi circundada com auxílio da ferramenta *free hand selections* e o valor foi obtido (*Analyze/Measure*) (Figura 3), sendo posteriormente, transformado em percentagem de área ulcerada por regra de três simples.

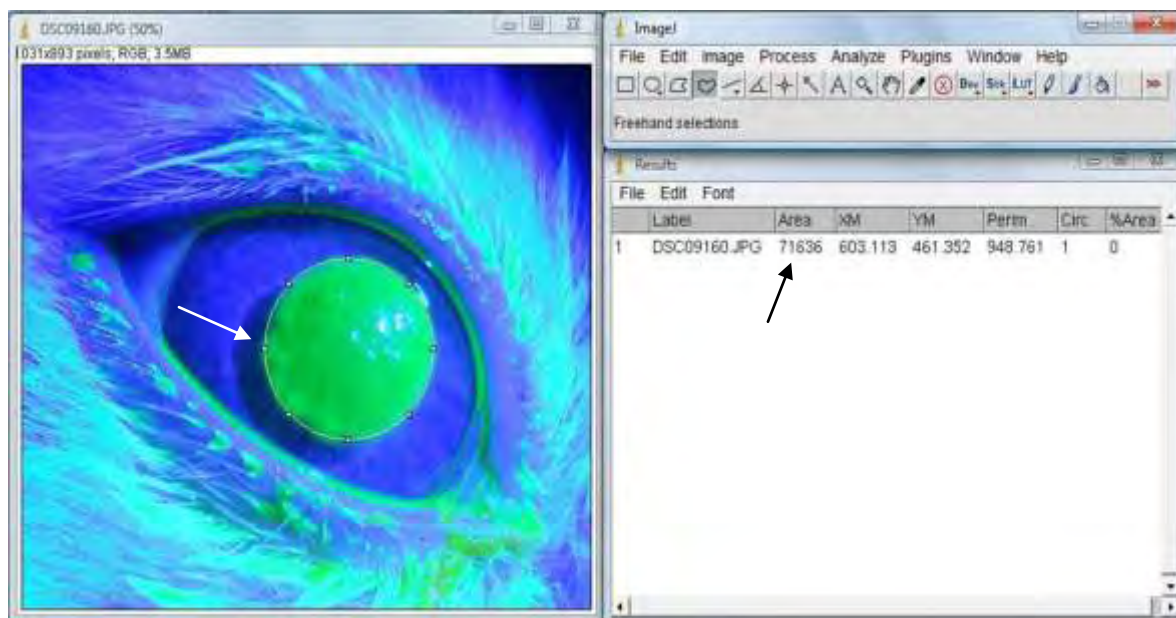


Figura 3. Quantificação da área ulcerada com *software* específico¹⁷, em olho direito de coelho macho adulto da raça Nova Zelândia Branco. A área ulcerada em verde foi circundada (seta branca) com auxílio da ferramenta *free hand selections* e quantificada numericamente (seta preta). Jaboticabal, 2010.

3.6.2 Estesiometria

O limiar de sensibilidade corneal foi quantificado de forma mascarada, por meio de estesiometria²⁰ (STILES et al., 2003). Avaliou-se a região axial da córnea, por sua maior sensibilidade (KAPS et al., 2003; GOOD et al., 2003) (Figura 4). Quarenta e oito horas antes da realização das ceratectomias os animais foram submetidos ao procedimento, com intuito de condicioná-los com a estesiometria e aos examinadores. No dia seguinte deu-se início a avaliação do limiar de sensibilidade corneal basal, nos mesmos horários descritos previamente (8, 12, 16 e 20 horas) e 10 minutos após cada tratamento com sulfato de morfina a 1%. Decorridos 6, 11, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas da realização das ceratectomias, o limiar de sensibilidade corneal foi avaliado, 10 minutos após cada

²⁰Estesiometer CochetBonett® - L'unaeu, França.

tratamento, sempre no mesmo horário (11horas) e pelo mesmo observador.

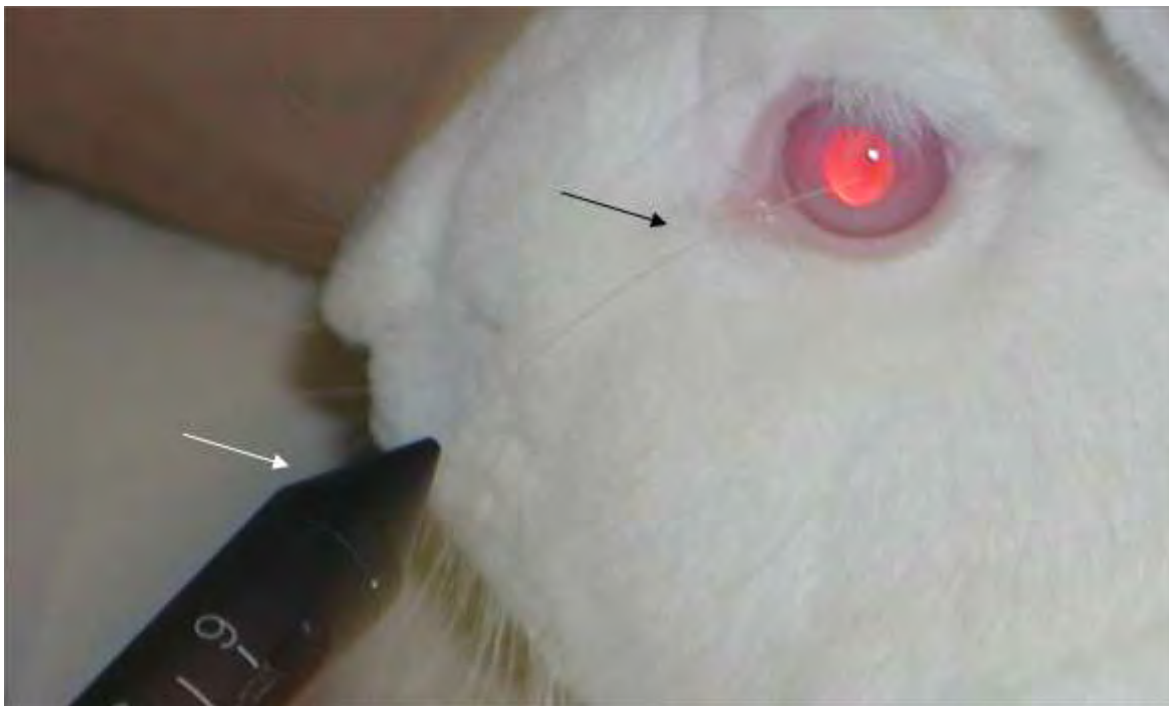


Figura 4. Imagem fotográfica ilustrando avaliação do limiar de sensibilidade corneal basal, com estesiômetro de Cochet Bonett, em coelho macho, adulto da raça Nova Zelândia Branco. Notar filamento de náilon em contato a córnea (seta preta) e estesiômetro (seta branca). Jaboticabal, 2010.

3.7 Histologia

Para confecção das lâminas, as córneas congeladas foram cortadas em micrótomo de congelamento à -20°C , com $10\mu\text{m}$ de espessura, coradas pela hematoxilina e eosina e avaliadas em microscópio de luz. Para quantificação do infiltrado inflamatório, empregou-se índice semi-quantitativo segundo a sua intensidade em ausente (0), discreto (1), moderado (2) e severo (3).

3.8 Imunoistoquímica

Para avaliação da distribuição tecidual da metaloproteinase-1 (MMP-1), da metaloproteinase-9 (MMP-9) e do colágeno tipo IV, realizou-se imunofluorescência. Para tal, as lâminas contendo os cortes congelados foram acondicionadas em temperatura ambiente, por 10 minutos, e, posteriormente, hidratadas em solução de fosfato tamponado (PBS), por mais 10 minutos. Procedeu-se à fixação do tecido corneal às lâminas, em imersão de paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram

lavadas em berço de imersão, com solução de PBS por 30 minutos. Ato contínuo, anticorpo policlonal primário reconhecedor de epítomos, para ambas as formas, ativa e inativa da MMP-1²¹ e anticorpo monoclonal primário reconhecedor de epítomos, para ambas as formas, ativa e inativa da MMP-

9²², assim como para o anticorpo monoclonal primário específico para o colágeno tipo IV²³, foram empregados nas respectivas diluições de 1:200 (MMP-1), 1:400 (MMP-9) e 1:50 (colágeno tipo IV), em diluente de anticorpo específico²⁴. Em cada lâmina, instilou-se 100µL das alíquotas diluídas para cada anticorpo descrito. Nos controles negativos, não foi instilado anticorpo primário.

Para incubação dos anticorpos primários, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida escura e levadas à estufa em temperatura de 37° C, onde permaneceram por 2 horas. Posteriormente, elas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e novamente lavadas em PBS, por 30 minutos. Ato contínuo, elas receberam três gotas de anticorpo secundário anti-soro de cabra²⁵ e foram novamente acondicionadas em câmara úmida escura por uma hora, em temperatura ambiente.

Após lavagem em PBS por 30 minutos, as lâminas incubadas com os anticorpos reconhecedores de MMP-1, anti-MMP-9 e do colágeno IV, foram reveladas com 100µL do conjugado Cy3 (1:100)²⁶ em diluente de anticorpo específico²³, visando a promover fluorescência dos anticorpos estudados. Posteriormente, elas foram mantidas em escotofase, por uma hora, em temperatura ambiente.

Decorridos os procedimentos relativos à incubação e revelação de anticorpos, as lâminas foram lavadas em PBS, por 30 minutos, secas e montadas em lamínulas. Para tal, utilizou-se 50µL de meio de montagem específico²⁷, acrescido de 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:1000), para se obter fluorescência dos núcleos celulares. As lâminas foram fotografadas em

²¹ Anti-MMP-1 Rabbit pAb® – Cabiochem, Darmstad, Alemanha

²² Anti-MMP-9 (Ab-3) Mouse mAb (56-2A4)® – Cabiochem, Darmstad, Alemanha

²³ Anti-Collagen Type IV (Ab-2) Mouse mAb (CIV22)® – Cabiochem, Darmstad, Alemanha

²⁴ Diluente de Anticorpo com componentes redutores de Background® – DAKO, Carpinteria, EUA

²⁵ LSAB Universal – Biotinylated Link Universal (Rb/Mo/Goat)® – DAKO, Carpinteria, EUA

²⁶ Conjugado Extravidin - Cy3® – Sigma Aldrich do Brasil, São Paulo, Brasil

²⁷ Meio de Montagem Aquoso, Fluoromount® – Sigma Aldrich do Brasil, São Paulo, Brasil

microscópio com luz fluorescente²⁸ e as imagens processadas em *software* específico²⁹.

Para a contabilização da intensidade e do percentil de células marcadas, empregou-se índice semi-quantitativo (STERN et al., 2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da imunomarcagem por índice semi-quantitativo

Índice	Marcação
0 – 0,5	Ausência de detecção – < 10%
1	10%–25%
2	25%–50%
3	> 50%
4	> 75%
5	> 95%

Fonte: STERN et al. (2006)

3.9 Zimografia

Após descongeladas, cada amostra de córnea foi homogeneizada à 20.000 rotações por minuto, durante 20 segundos em solução tampão de Tris-HCL 50mM, em pH7,4, enriquecido com 5mM de CaCl₂, 0,1% de Triton X-100 e 1% de substância inibidora de proteases inespecíficas³⁰. e posteriormente incubadas por 2 horas a 4°C, após esse período a solução foi centrifugada (4000g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante coletado. O conteúdo total de proteína foi mensurado de acordo com o método de Bradford, utilizando a albumina sérica bovina como proteína padrão.

Quinze microlitros de cada amostra aplicados no gel de gelatina para zimografia³¹. Ato contínuo realizou-se a etapa de pré-tingimento³² e reconhecimento do peso molecular das formas latentes e ativas de MMP-2 e MMP-9³³. Os géis foram submetidos à eletroforese, com voltagem constante de 125V por, aproximadamente 2 horas.

Após a eletroforese os géis foram clareados em água deionizada, lavados em solução de renaturação³⁴ e mantidos durante 1 hora à temperatura de 37°C para a reativação das MMPs. Em seguida, eles foram incubados em agitador

²⁸ Axio Imager A1®, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, Brasil

²⁹ Axio Vision LE®, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, Brasil

³⁰ Coquetel Inibidor de Protease®, Sigma Aldrich do Brasil, São Paulo

³¹ 10% Novex Zymogram gelatin gels® - Invitrogen do Brasil, São Paulo.

³² Blue prestained standards® - Invitrogen do Brasil, São Paulo.

³³ Oncogen, Boston®, MA, USA.

³⁴ Triton X – 100, Novex zymogram renaturing buffer® - Invitrogen do Brasil, São Paulo.

rotativo acrescidos de tampão³⁵ por 24 horas, à temperatura de 37°C, com o objetivo de possibilitar a renaturação das MMPs e a digestão do substrato. Após essa fase, os géis foram clareados, tingidos³⁶ e incubados durante uma hora. Posteriormente, eles foram lavados com ácido acético a 5% e solução de metanol 7,5%, visando maximizar o contraste entre as áreas de lise e as não digeridas.

A atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 foram quantificadas através da análise da distância entre a migração das bandas no gel, o peso molecular e o padrão de MMPs. A densidade óptica dos zimogramas foram escaneadas, digitalizadas, levadas ao densitômetro de imagens e analisadas em *software* específico³⁷.

3.10 Imunoensaio ligado à enzima (ELISA)

Para detecção da interleucina 10³⁸, cada poço de uma placa de *ELISA* foi sensibilizado com 50µL de anticorpo de captura (1:250), por 12 horas, à temperatura de 4° C. Posteriormente, a placa foi lavada em solução fosfato tampão detergente 0,05% (PBS-T), por 3 vezes e foi seca. Procedeu-se ao bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de PBS, acrescida de soro fetal bovino 10%³⁹, (150µL/poço), por 1 hora, em temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada em PBS-T, por 5 vezes, e procedeu-se a realização da curva padrão. Após lavagem com PBS-T, por 5 vezes, adicionou-se 50 µL /poço de anticorpo de detecção, diluído em soro fetal bovino 10%³⁷ (1:250), acrescido de estreptoavidina-peroxidase⁴⁰, por 1 hora, em temperatura ambiente e escotofase. A placa foi lavada por 7 vezes com PBS-T e a reação foi revelada com 3,3', 5, 5' - Tetrametilbenzidina⁴¹ (50µL/poço), após incubação 30 minutos, em temperatura ambiente. A leitura foi feita em filtro de 450 nm⁴².

³⁵ Novex Zymogram developing buffer[®] - Invitrogen do Brasil, SP, Brasil.

³⁶ Coomassie Blue Rapid[®] - Diversified Biotech, Boston, USA

³⁷ 4.2.1 Beta version[®] – Bio Rad, EUA

³⁸ IL-10 murine[®], BioScience BD, EUA

³⁹ Soro Fetal Bovino[®], Cuntilab, Campinas, Brasil

⁴⁰ Monoclonal Anti-Rat IgG2a antibody produced in mouse[®], Sigma Aldrich do Brasil, São Paulo, Brasil.

⁴¹ TMB[®], Sigma Aldrich do Brasil, São Paulo, Brasil.

⁴² Opsys MR[™] – Dynex Technologies[®], EUA

3.11 Avaliação estatística

Os dados foram avaliados, quanto à sua normalidade, ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Empregou-se Análise de Variância para Medidas Repetidas, com posterior avaliação pelo teste Bonferroni, nas avaliações relativas à estesiometria e a evolução da área ulcerada. Os parâmetros mensurados na histologia, imunoistoquímica, zimografia e no na reação de imunoensaio ligado á enzima, foram avaliados Análise de Variância de Via Única, com posterior avaliação pelo teste de Bonferroni. Aplicou-se o Teste T Student na avaliação da média de dois grupos ou de dois períodos. A área sob a curva foi calculada nas avaliações relativas à evolução da área ulcerada e na concentração tecidual de interleucina-10. Em todas as análises considerou-se o nível mínimo de significância $p \leq 0,05$ ⁴³. Os resultados encontram-se apresentados na forma de média e erro padrão da média.

⁴³SigmaStat 3.0[®], Systat Software inc, San Jose, USA

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação clínica

4.1.1 Tempo de epitелização

Decorridas as ceratectomias, todos os pacientes foram positivos à fluoresceína. Relativamente ao diâmetro trepanado (6mm), aos seis dias de pós-operatório, apenas um animal do grupo controle (GC) ainda apresentava, no olho direito (OD), 1,08% da área trepanada positiva à fluoresceína e 0,14% no olho esquerdo (OE). Nos animais do grupo morfina (GM), aos seis dias de pós-operatório, dois animais ainda apresentavam positividade à fluoresceína. O tempo médio de epitелização das córneas do olho direito e do olho esquerdo, nos animais do GC foi de, respectivamente, $6,12 \pm 0,22$ dias no GC e de $6,25 \pm 0,31$ dias no GM, sem diferença significativa entre os grupos ($p=0,75$), Tabela 2. Ademais, não se constatou diferença significativa entre o percentual da área ulcerada, entre os olhos direito e esquerdo de ambos os grupos, em qualquer dos períodos estudados ($p=1,00$) (Figura 5). Não obstante, foi constatada maior área sob a curva no GM (298,3), comparativamente ao GC (258,8).

Tabela 2. Estatística descritiva nos grupos controle e morfina, dos valores relativos ao tempo de reepitelização (dias), em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

Grupos	Tempo de epitелização (dias)
Controle	
Média±Erro padrão	$6,12 \pm 0,22$
Máximo	7,0
Mínimo	5,0
Coeficiente de variação (%)	10,46
Morfina	
Média±Erro padrão	$6,25 \pm 0,31$
Máximo	8,0
Mínimo	5,0
Coeficiente de variação (%)	14,18
Teste T Student ($p=0,75$)	

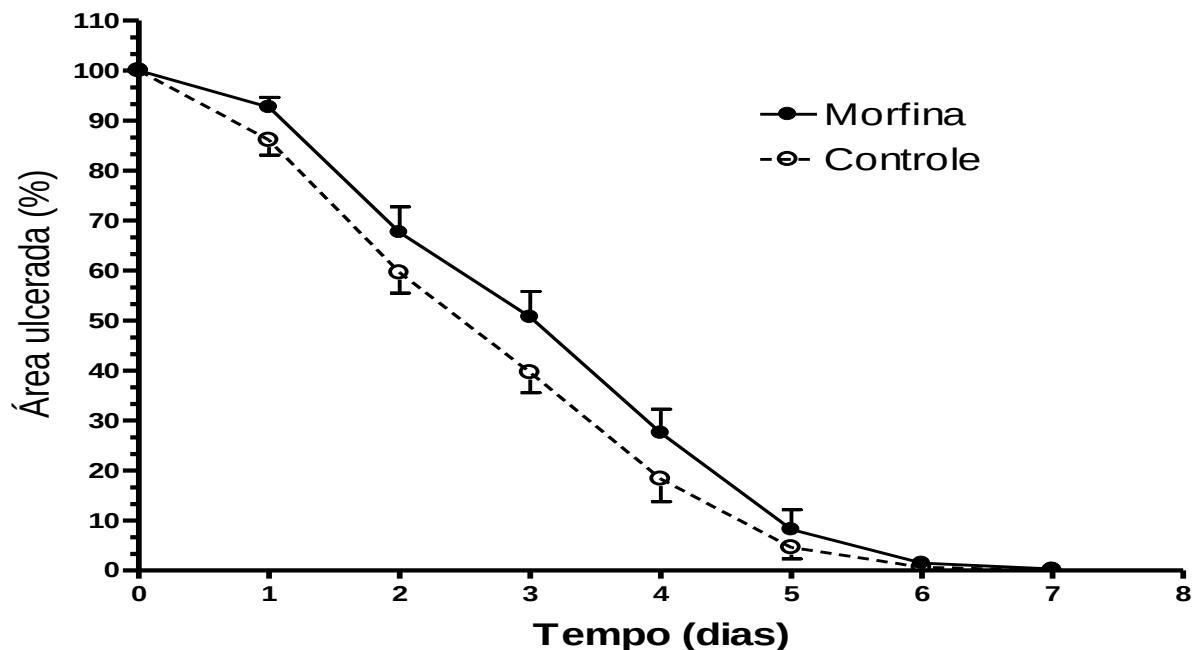


Figura 5. Valores relativos ao percentual da área ulcerada circundada, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

Teste Bonferroni ($p=1,00$)

Resultado similar foi reportado em coelhos ceratectomizados (PEYMAN et al., 2004). Em cães com úlcera de córnea e no homem submetidos à cirurgias refrativas, a instilação de morfina não retardou a epitelização corneal (STILES et al., 2003; FAKTOROVICH & BASBAUM, 2010).

A inibição da substância P, provavelmente provocada pela instilação de morfina, pode justificar os halos ulcerados de maior diâmetro nos coelhos tratados com morfina 1%. Não obstante, a instilação de substância P em coelhos, não acelerou a epitelização corneal após abrasões químicas, sugerindo que, nessa espécie, outros peptídeos seriam necessários para epitelização corneal (KINGSLEY & MARFURT, 1997).

Outra condição que justificaria uma maior área sob a curva nos pacientes que receberam morfina, relaciona-se à existência de um peptídeo opióide endógeno ($[Met^5]$ - encefalina), também denominado Fator de Crescimento Opióide, envolvido na regulação do crescimento epitelial da córnea de coelhos (ZAGON et al., 1998), de seres humanos (ZAGON et al., 2000) e de ratos (ZAGON et al., 2006). A imunomarcagem de tais receptores para substância P e do fator de Crescimento Opióide ou a quantificação de sua expressão gênica

poderiam esclarecer a ocorrência de halos de maior diâmetro, nos animais que receberam morfina.

Optou-se pela utilização da tobramicina como agente antimicrobiano, haja vista sua baixa epiteliotoxidade, comparativamente às quinolonas (HENDRIX et al., 2001, REVIGLIO et al., 2003a). Peyman et al. (1994) reportaram a ocorrência de infecção ocular em coelhos submetidos a ceratectomias experimentais, sem profilaxia antibiótica.

O uso de antibiótico local, não permite cotejar se a morfina favoreceria a colonização e a disseminação de patógenos, como reportado na pele de camundongos (MARTIN et al., 2010). Entretanto, no estudo de Peyman et al. (1994), apenas um coelho desenvolveu infecção corneal, decorridos seis dias do tratamento local com morfina 0,5%. No mesmo período, quatro coelhos do grupo controle desenvolveram infecção corneal local.

4.1.2 Estesiometria

Relativamente ao limiar de sensibilidade corneal basal, não se observou diferença estatística em qualquer dos períodos estudados, após a instilação de 50µL de sulfato de morfina a 1% ($p=1,00$) (Figura 6).

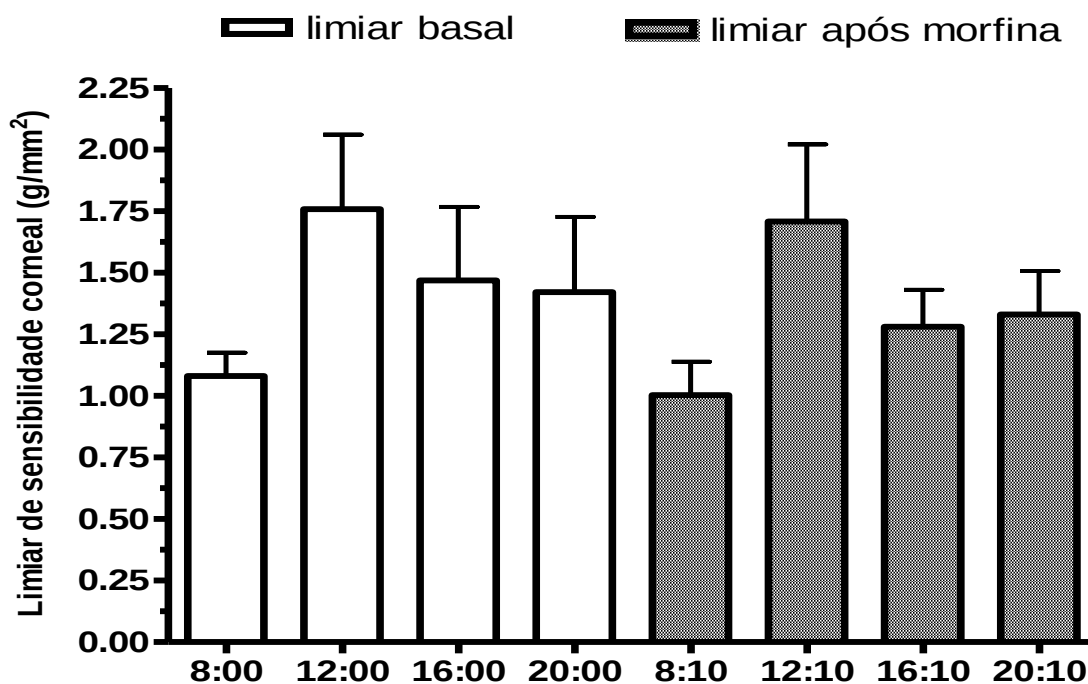


Figura 6. Valores relativos ao limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), nos grupos controle e morfina, antes e após a instilação de 50µL de sulfato de morfina, na córnea de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2010.

Teste Bonferroni ($p = 1,00$).

Resultados similares foram notificadas em córneas desinflamadas de cães e de ratos, após o uso do mesmo agente (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003). Segundo Stiles et al. (2003), Wenk et al. (2003) e Wenk et al. (2006), para que a síntese de receptores opióides se intensifique, a instalação de uma injúria periférica, com subsequente liberação de citocinas, como a substância P, prostaglandinas e a expressão do peptídeo relacionado ao gene calcitonina devem estar presentes. A ausência de tais elementos, em concentrações adequadas, justifica a ineficácia do sulfato de morfina, que fora instilado localmente em olhos desinflamados. Em equinos, a instilação do opióide agonista kapa/antagonista mu, nalbufina 1%, também não exerceu qualquer efeito sobre o LSC, durante uma avaliação de 120 minutos (WOTMAN et al.,

2010). Entretanto, a nalbufina 1% elevou o LSC em cães saudáveis, 30 minutos após sua instilação (AQUINO et al., 2005). A disparidade de tais resultados, relativamente ao uso da nalbufina 1% em diferentes espécies, pode ser atribuída ao condicionamento dos cães com a estesiometria depois de repetidas aferições (AQUINO et al., 2005). A afirmativa pode ser justificada, pelo fato de que em outro estudo, também conduzido em cães, a substância não exerceu qualquer efeito analgésico, antes ou após a confecção de úlceras corneais (CLARK et al., 2009).

No homem, a quantificação do limiar de sensibilidade corneal pode ser influenciada por diversos fatores como idade, ciclo hormonal, hora do dia, umidade, temperatura ambiente, coloração da íris, uso de lentes de contato, fármacos, cirurgias, doenças oculares como uveíte, glaucoma, ceratite herpética, ceratoconjuntivite seca, estesiômetro empregado e habilidade do investigador (BELMONTE et al., 2004). Em cães, diabetes melitus, ciclotocoagulação a *laser* e o glaucoma, elevam o limiar de sensibilidade corneal (WEIGT et al., 2002, CULLEN et al., 2005, BLOCKER et al., 2007). Mesmo que todos os coelhos utilizados no experimento eram machos saudáveis da mesma raça, idade, foram avaliados nos mesmos períodos e por um mesmo avaliador familiarizado como o procedimento, acredita-se que as situações acima expostas, não tenham influenciado, relativamente à obtenção do limiar de sensibilidade corneal. Todavia, ressalva-se que o estesiômetro de Cochet Bonnet, utilizado na presente pesquisa, avalia apenas 20% do contingente neuronal exposto, como explicado por outros (BELMONTE, 2004).

Optou-se por se avaliar a região central da córnea, pois estudos prévios reportaram-se a ela, como a mais sensível em coelhos, bem como no homem, cães, gatos, cavalos e cobaias, por sua maior densidade neuronal (RÓZSA et al., 1982, GOOD et al., 2003, KAPS et al., 2003, TROST et al., 2007, KALF et al., 2008). Relativamente ao número de troncos nervosos presentes no estroma e ao limiar de sensibilidade, a córnea do homem se destaca (30 a 80 troncos nervosos), seguida pela de gatos (16 a 20 troncos nervosos), e de coelhos (12 a 16 troncos), sendo a dos cães, a menos sensível (13-14 troncos) (MÜLLER et al., 2003).

Decorridas seis horas das ceratectomias, os valores relativos ao limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2) do grupo controle (GC) não diferiram

significativamente dos grupo morfina (GM) ($p=0,99$), tampouco dos basais ($p>0,05$). Decorridas onze horas, os valores do GM se elevaram, em 88,67%, significativamente, em comparação aos do GC ($p=0,01$). Decorridos 24 horas das ceratectomias, até a reepitelização das córneas, os valores limiar de sensibilidade corneal do GM mantiveram-se sempre elevados, comparativamente aos valores do GC. Observou-se, significância estatística ($p<0,05$) às 72 e 96 horas (Figura 7).

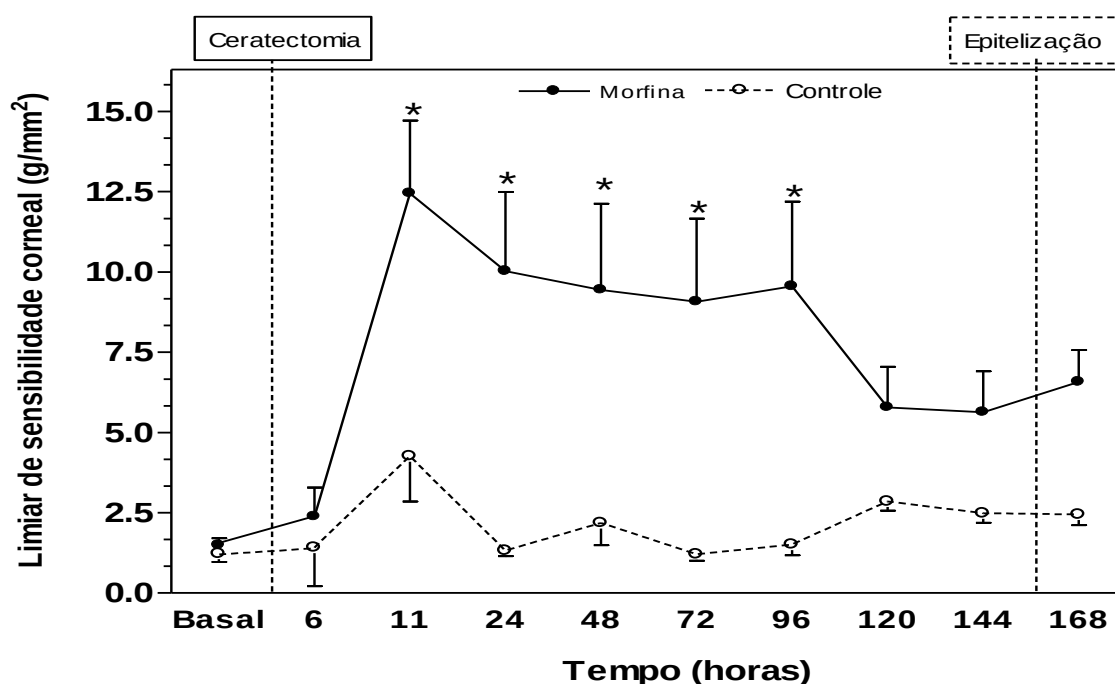


Figura 7. Valores relativos ao limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2) entre os olhos direito e esquerdo, nos grupos controle e morfina, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, antes e decorridas 6, 11, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

*Teste Bonferroni ($p<0,05$)

Resultados similares foram reportados em cães acometidos por úlcera indolente e no homem com abrasões corneais pós-vitrectomia (PEYMAN et al., 1994; MURPHY et al., 2001). Tais achados comprovam o resultado de pesquisas anteriores, ao mostrarem que, aproximadamente, 70% das fibras sensoriais da córnea são de origem polimodal, sendo sensibilizáveis pelo calor, irritantes externos e por mediadores químicos endógenos, como prótons, íons de potássio, prostaglandinas e outros metabólitos do ácido aracdônico, citocinas,

aminas e fatores de crescimento. Apenas 20% das fibras corneais respondam a forças mecânicas (BELMONTE et al., 2004). Estesiômetros que avaliem o LSC por outros mecanismos, que não o mecânico (gás, calor e frio), poderiam demonstrar alterações no LSC após as ceratectomias (BELMONTE et al., 2004).

Apenas 11 horas após as ceratectomias, os pacientes tratados com morfina apresentaram analgesia corneal significativa, demonstrada pela elevação no LSC. Tais achados corroboram com os de outros autores, que admitem a necessidade de síntese de substância P e do peptídeo relacionado ao gene calcitonina para que a morfina exerça seus efeitos analgésicos (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003).

Em cães com úlceras superficiais criadas experimentalmente, o sulfato de morfina 1% elevou significativamente o LSC, apenas 48 horas após as intervenções (STILES et al., 2003). Em contrapartida, os mesmos autores observaram redução no blefarospasmo, 24 horas após as ceratectomias (STILES et al., 2003). Em ratos, a instilação local de morfina propiciou efeito analgésico, 6 horas após abrasões corneais com nitrato de prata (WENK et al., 2003). Não obstante, no estudo de Wenk et al. (2003), apenas o blefarospasmo foi quantificado após estimulação pela capsaicina. Em indivíduos acometidos por úlceras corneais pós-vitrectomia, demonstrou-se que o sulfato de morfina 0,5% produziu analgesia corneal, decorridos 20 minutos de sua aplicação (PEYMAN et al., 1994). Porém, não foi reportado, há quanto tempo os pacientes estavam sofrendo com as úlceras (PEYMAN et al., 1994). Outro estudo demonstrou que o agente utilizado na mesma concentração, reduziu em 50% os sinais de dor em pacientes submetidos à ceratectomia fotorefrativa, já no primeiro dia pós-operatório (FAKTOROVICH & BASBAUM, 2010). A existência de receptores opióides mu e delta e de substância P na córnea de cães, ratos e do homem justifica tais achados (MURPHY et al., 2001; STILLES et al., 2003; ZÖLLNER et al., 2008). Não foram logrados os mesmos resultados após o uso local de 10µg de fentanil, em pacientes com ulceração corneal traumática (ZÖLLNER et al., 2008). Os autores da pesquisa admitem que a dose de fentanil utilizada possa ter sido muito baixa, ou que o agente não foi eficaz, por sua alta lipossolubilidade adentrando diretamente a câmara anterior (ZÖLLNER et al., 2008). A presença de receptores opióides na córnea de coelhos ainda não foi estudada, mas a

eficácia da morfina, observada 11 horas após as ceratectomias, sugere que tais receptores são sintetizados em córneas inflamadas.

Acredita-se que o aumento na síntese de receptores não seja o único mecanismo pelo qual fármacos opióides tornem sua eficácia aumentada na inflamação (WENK et al., 2003). Na pele, novas proteínas, sintetizadas na raiz do gânglio dorsal, são transportadas a terminais periféricos no interregno de poucos dias. A aplicação local de agentes opióides em tecidos inflamados pode, todavia, controlar a hiperalgesia em poucas horas (CZLONKOWSKI et al., 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995; ZHOU et al., 1998; WENK et al., 2003).

Uma justificativa para que agentes opióides sejam eficazes em estágios precoces da inflamação, se deve ao tráfico de receptores opióides alojados em membranas terminais de axônios (WENK et al., 2003; 2006). Admite-se que leucócitos, terminais periféricos de alguns neurônios aferentes e o próprio filme lacrimal, possam ser responsáveis pelo transporte de receptores opióides em estruturas avasculares, como a córnea (WENK et al., 2003). Entretanto, o uso local de nalbufina 1%, após ceratectomias experimentais em cães, não ensejou analgesia corneal, o que se deve provavelmente, ao curto período de avaliação (seis horas) adotado pelos pesquisadores, ou a ausência de receptores opióides corneais do tipo kapa (CLARK et al., 2009). O uso local de morfina 1%, só foi eficaz em reduzir a hiperalgesia na córnea de cães, decorridos 48 horas do trauma cirúrgico (STILES et al., 2003).

Na presente pesquisa, a morfina reduziu significativamente a dor corneal, durante quatro dias. Posteriormente, observou-se diminuição de 40% no limiar de sensibilidade corneal (LSC). Mesmo sem significância estatística, cinco dias após a ocorrência das úlceras, os animais que receberam morfina ainda apresentavam o LSC 50% mais elevado que aqueles tratados com solução salina. Tolerância ao fármaco pode justificar o evento, que fora constatado ao quinto dia, relativamente a redução no LSC nos coelhos do grupo morfina.

Sabe-se que a tolerância aos efeitos analgésicos da morfina desenvolvem-se rapidamente. Várias hipóteses são apontadas como responsáveis por esse fenômeno, incluindo a fosforilação de receptores opióides (por promover a alteração da conformação dos receptores), a internalização ou a diminuição na síntese de receptores do tipo mu, a regulação positiva da via do AMP cíclico (um mecanismo contraregulatório aos efeitos dos opióides) e o

aumento na síntese de glicoproteína P (molécula relacionada ao efluxo e à resistência de fármacos) (AQUILANTE et al., 2000; KOCK & HÖLLT, 2008; OKURA et al., 2009; ROSHANPOUR et al., 2009).

Em ratos tratados com morfina pela via oral (100mg/kg/dia), os efeitos antinociceptivos do fármaco contra o pinçamento da cauda, foram significativamente reduzidos três dias após o início da terapia (OKURA et al., 2009). Outrossim, observou-se diminuição significativa na absorção intestinal de morfina ao quinto dia de uso contínuo do fármaco e que esse mecanismo foi mediado pela glicoproteína P (OKURA et al., 2009). Aquilante et al. (2000) reportaram que doses repetidas de morfina elevaram, em duas vezes, a expressão da glicoproteína P no cérebro de ratos e que o evento estava associado a uma diminuição nos efeitos antinociceptivos do fármaco.

Além da morfina, outros agentes com ação farmacológica antineoplásica, antiviral, anti-inflamatória, assim como análogos das prostaglandinas são substratos para a glicoproteína P (TSUJI et al., 1992; TERAOKA et al., 1996; PERLOFF et al., 2001; HARIRARAN et al., 2009). O mecanismo exato envolvido no efluxo de fármacos, do meio intracelular, para o compartimento extracelular é complexo e pouco compreendido (DEY et al., 2003). No olho, a glicoproteína P se expressa no endotélio capilar e no epitélio pigmentar da retina, no epitélio ciliar não pigmentado, no músculo ciliar, no estroma da íris, no epitélio conjuntival e na cornea (DEY et al., 2003). Admite-se que esse mecanismo possa estar envolvido no evento relativo à diminuição do limiar de sensibilidade corneal observado nos coelhos tratados com morfina, haja vista que a glicoproteína P está presente em células corneais desta espécie (DEY et al., 2003).

4.2 Histologia

Cortes corados pela hematoxilina e eosina mostraram ausência de epitélio corneal sobre a área trepanada, do primeiro ao terceiro dia, em 100% dos animais estudados (Figura 8). Decorridos seis dias das ceratectomias, observou-se monocamada de células epiteliais recobrindo o estroma, em três de quatro olhos no GC e em dois de quatro olhos no GM. Aos nove dias, constatou-se estratificação epitelial na maior parte da região da ceratectomia, em ambos os grupos. Aos 12 dias após as ceratectomias, foram observados estratificação do epitélio corneal e reorganização das lamelas do estroma em 100% dos animais de ambos os grupos (Figura 8).

O número de polimorfonucleares, linfócitos e plasmócitos foram observados de permeio à superfície estromal ulcerada e na região subepitelial, do primeiro ao terceiro dia da avaliação de forma discreta, em GC ($1,00 \pm 0,40$) e em GM ($1,25 \pm 0,25$), sem diferença significativa entre os grupos ($p=0,06$) (Figura 8). Ao sexto dia, apenas um animal do GC ainda apresentava infiltrado discreto ($p=0,06$). Dos nove aos 12 dias, não mais se observou infiltração de polimorfonucleares nas córneas do GC e do GM ($p=0,06$) (Figura 9).

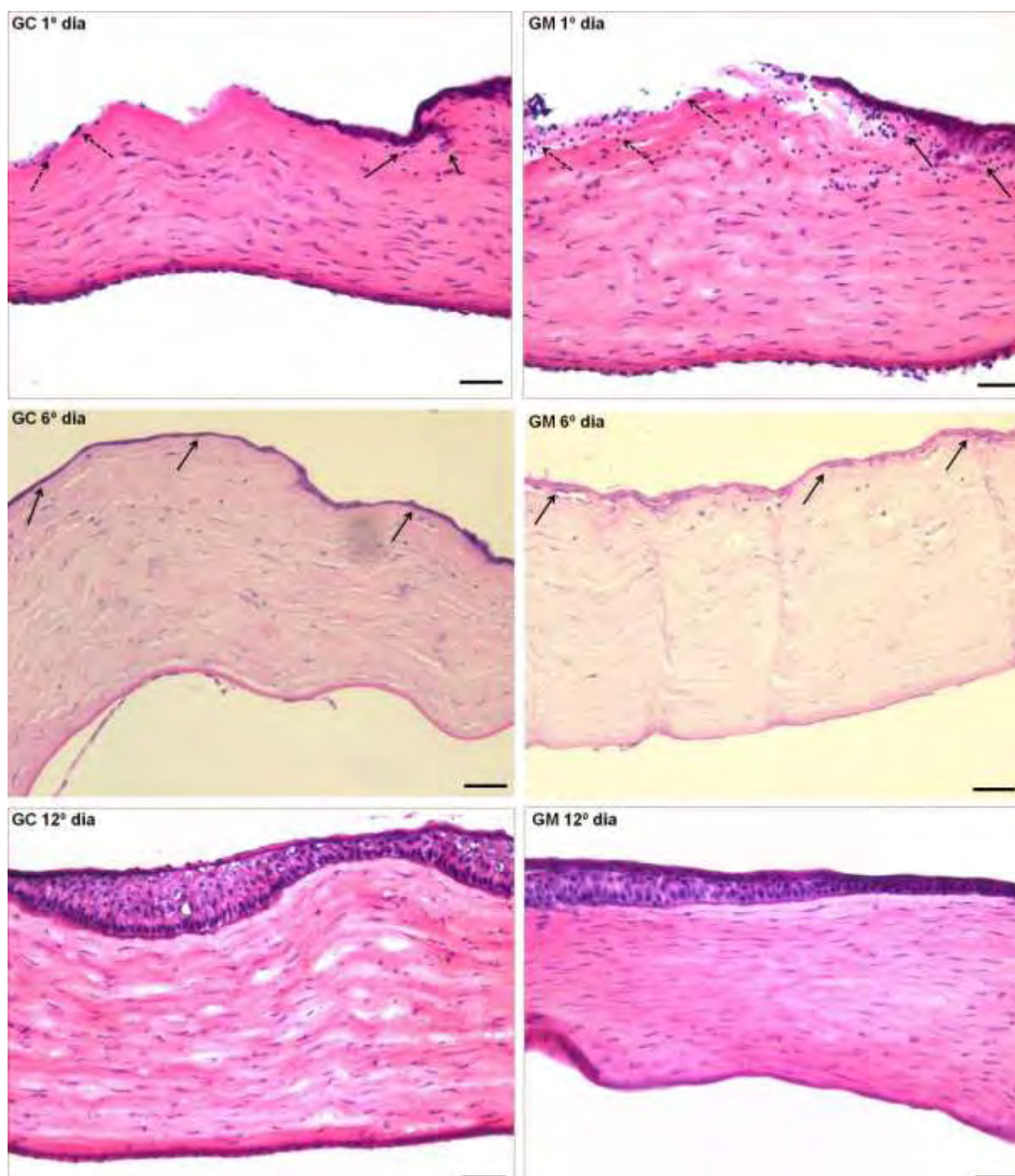


Figura 8. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM). Observar, ao primeiro dia, polimorfos nucleares na superfície estromal da região ulcerada (setas vasadas), assim como na região subepitelial (setas). Ao sexto dia, observa-se monocamada de células epiteliais (setas). Ao décimo segundo dia, observa-se estratificação do epitélio e reorganização das lamelas estromais, na superfície da área ulcerada. Jaboticabal, 2010. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50µm).

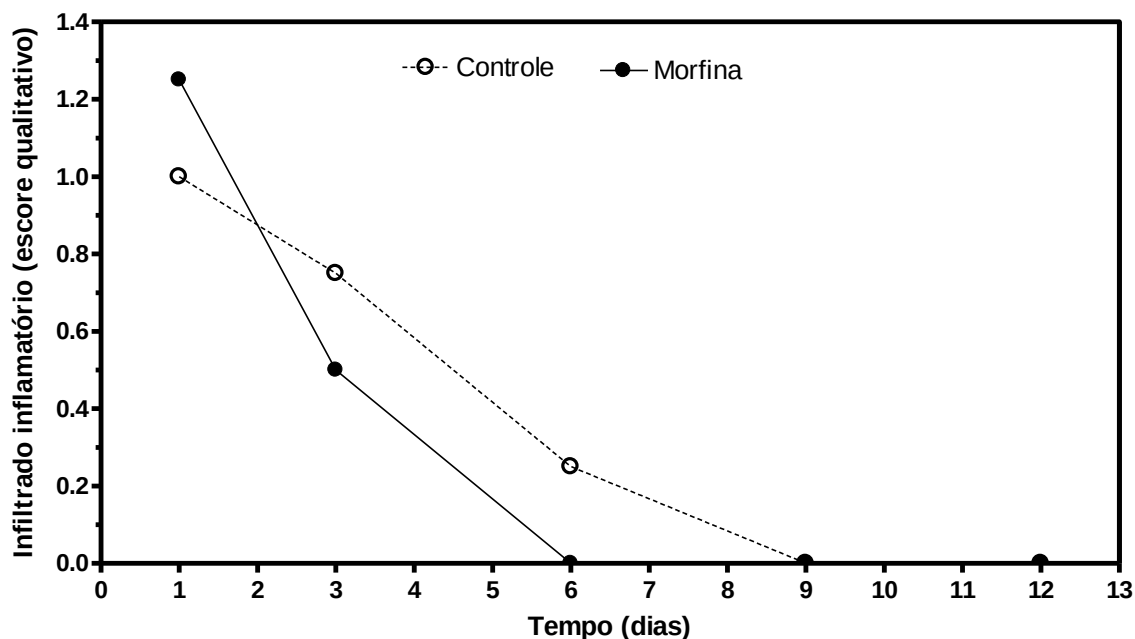


Figura 9. Valores relativos ao índice semi-quantitativo atribuído ao infiltrado inflamatório nos grupos controle e morfina, em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

Análise de variância de via única ($p=0,06$)

Previamente à realização do estudo, apenas duas publicações mostraram resultados histológicos na córnea de animais tratados com solução local de morfina (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003). Stiles et al. (2003) não reportaram alterações teciduais significativas na córnea de cães que receberam morfina 0,5%, após ceratectomias. Apenas após a epitelização completa, os tecidos corneais foram processados à histologia e o número de células inflamatórias não foi quantificado (STILES et al., 2003). Wenk et al. (2003) observaram diminuição significativa, quanto a infiltração de células inflamatórias na córnea de ratos tratados com morfina, quatro a 24 horas após abrasão com nitrato de prata, comparativamente aos ratos cujas córneas receberam solução salina (WENK et al., 2003).

Em camundongos, lesões cutâneas tratadas localmente com morfina apresentaram reparação cicatricial retardada, pela redução na migração de leucócitos (MARTIN et al., 2010). O evento favoreceu a colonização e a disseminação sistêmica de bactérias inoculadas no sítio lesionado (MARTIN et al., 2010). Observou-se que a aplicação parenteral de morfina foi eficaz em

reduzir a expressão cutânea da interleucina-1 beta, da interleucina-6, do fator de necrose tumoral-alfa, assim como a infiltração local de neutrófilos, duas horas após a injeção de lipopolissacarídeos (CLARK et al., 2007). Estudos conduzidos no homem e em primatas mostraram que opióides suprimem a quimiotaxia e a migração de neutrófilos (LIU et al., 1992; CHOI et al., 1999).

A infiltração de polimorfonucleares é necessária para que ocorra epitelização, após lesão corneal (GAN et al., 1999). Admite-se, que células inflamatórias, notadamente os neutrófilos, secretem fatores de crescimento, denominados trefonas, capazes de estimular o crescimento de fibroblastos. O infiltrado inflamatório exerce sua influência sobre as células residentes, através da secreção de citocinas, que coordenam a trama celular interativa durante a reparação cicatricial (GAN et al., 1999). Após lesão corneal, a migração de neutrófilos para o estroma ocorre em dois momentos. O primeiro é dependente de moléculas de adesão (P e E-selectina) e de CD18, e o segundo, apenas de moléculas de adesão, indicando que a migração precoce de leucócitos promova epitelização (LI et al., 2006).

Nos coelhos do presente estudo, não se observaram alterações significativas no índice quali-quantitativo de células inflamatórias, entre os grupos, em qualquer dos períodos avaliados. O evento pode ser atribuído à natureza da lesão cirúrgica instituída, que no presente estudo foi menos agressiva, quando comparada à abrasão química com nitrato de prata utilizada na córnea de ratos (WENK et al., 2003). Ressalva-se, que a indiferença observada no quantitativo inflamatório entre os grupos aqui estudados, possa ser a responsável pelas indiferenças, quanto ao tempo de epitelização observado clinicamente (GAN et al., 1999; LI et al., 2006).

4.3 Imunoistoquímica

No primeiro dia após as ceratectomias, observou-se imunomarcção da MMP-1 no interstício das células epiteliais, adjacentes ao leito ulcerado, assim como na porção superficial do estroma ulcerado, em cerca de 25% do campo microscópio examinado (Figuras 10 e 12), em ambos os grupos ($p>0,05$). No terceiro dia, imunomarcção de cerca de 40% do campo examinado nos animais do GC e, em cerca de 50%, nos do GM ($p>0,05$) (Figuras 11 e 12).

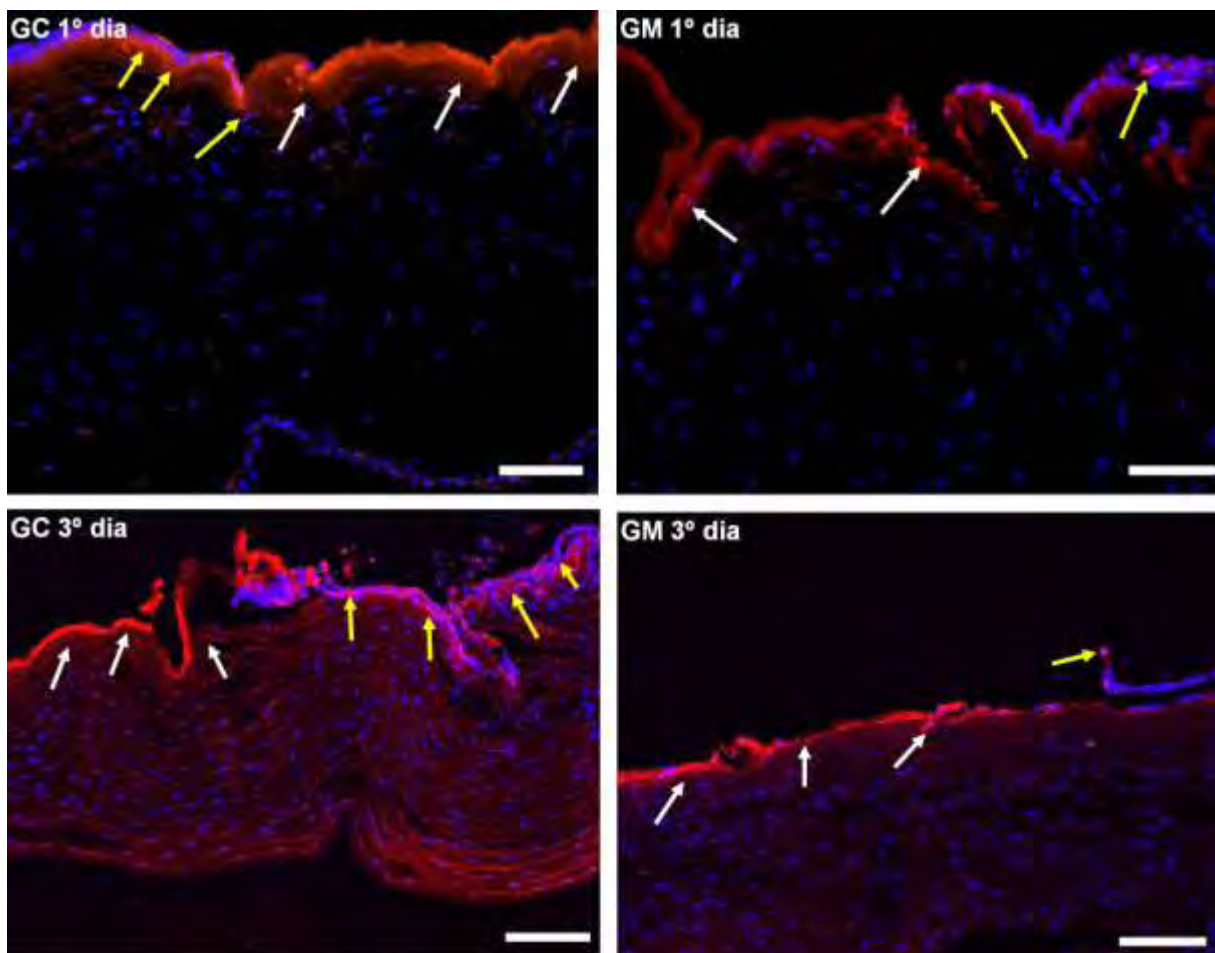


Figura 10. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-1 (MMP-1), 1 e 3 dias após as ceratectomias. Observar expressão da MMP-1 na superfície estromal da região ulcerada (setas brancas) e na região subepitelial adjacente ao leito ulcerado (setas amarelas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010. (Barra = 20 μ m).

No sexto dia, 80% da região de membrana basal e algumas células epiteliais recém formadas apresentaram-se marcadas para MMP-1 nos indivíduos do GC e, em cerca de 90% dos do GM ($p>0,05$) (Figuras 11 e 12). Do nono ao décimo segundo dia, o índice de imunomarcção decresceu de maneira similar, constatando-se, ainda imunomarcção de 25% da região superficial do estroma, de permeio à membrana basal do epitélio corneal, assim como no interstício de algumas células epiteliais, de forma pouco intensa, sem diferença entre os grupos ($p>0,05$) (Figuras 11 e 12).

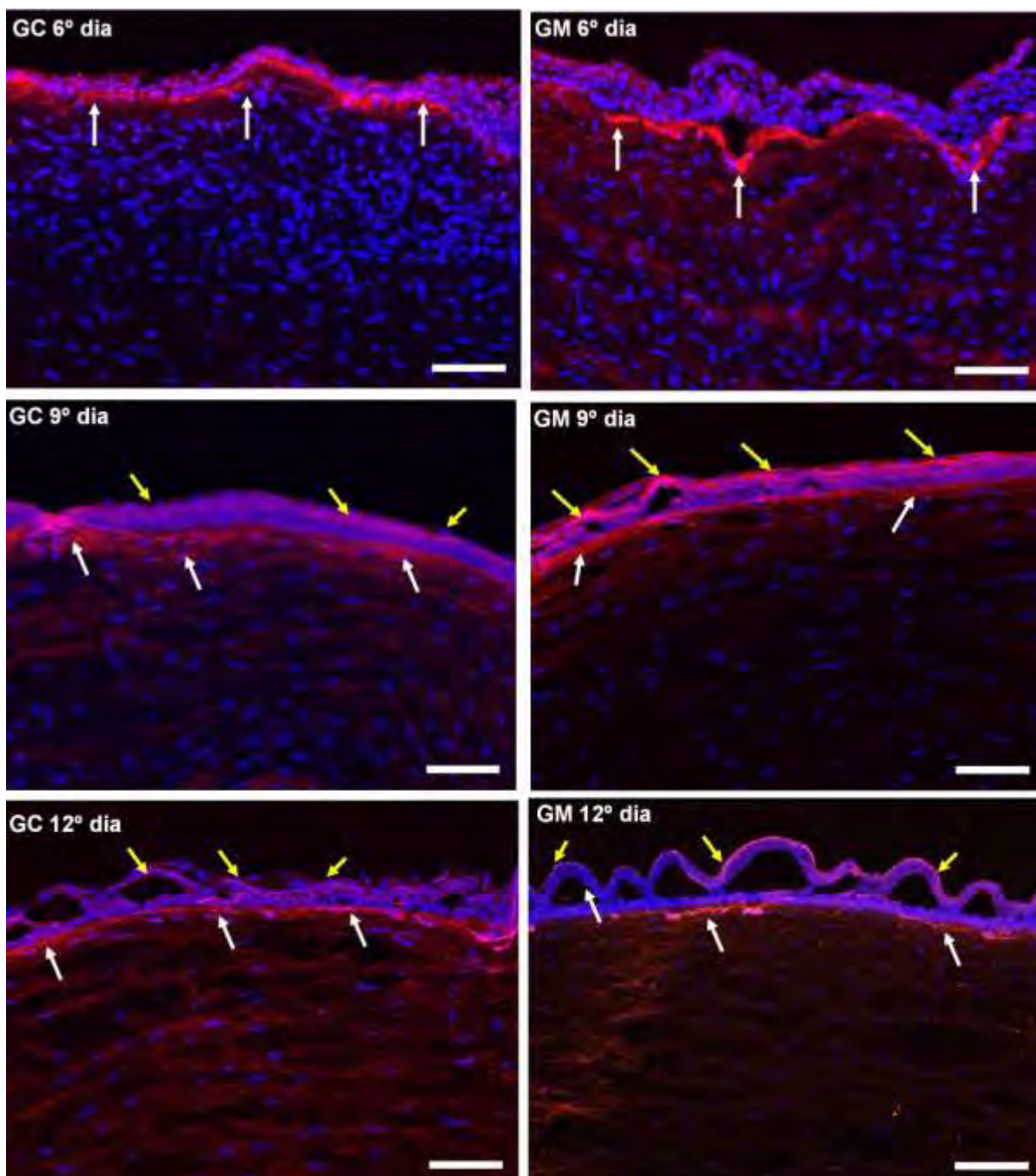


Figura 11. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-1 (MMP-1) 6, 9, e 12 dias após as ceratectomias. Observar ao sexto dia após as ceratectomias, expressão da MMP-1 na superfície estromal (setas brancas) e no epitélio corneal (setas amarelas). Ao décimo segundo dia, ainda observa-se a expressão da MMP-1, na região subepitelial (setas brancas) e no epitélio corneal (setas amarelas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010. (Barra = 400 μ m).

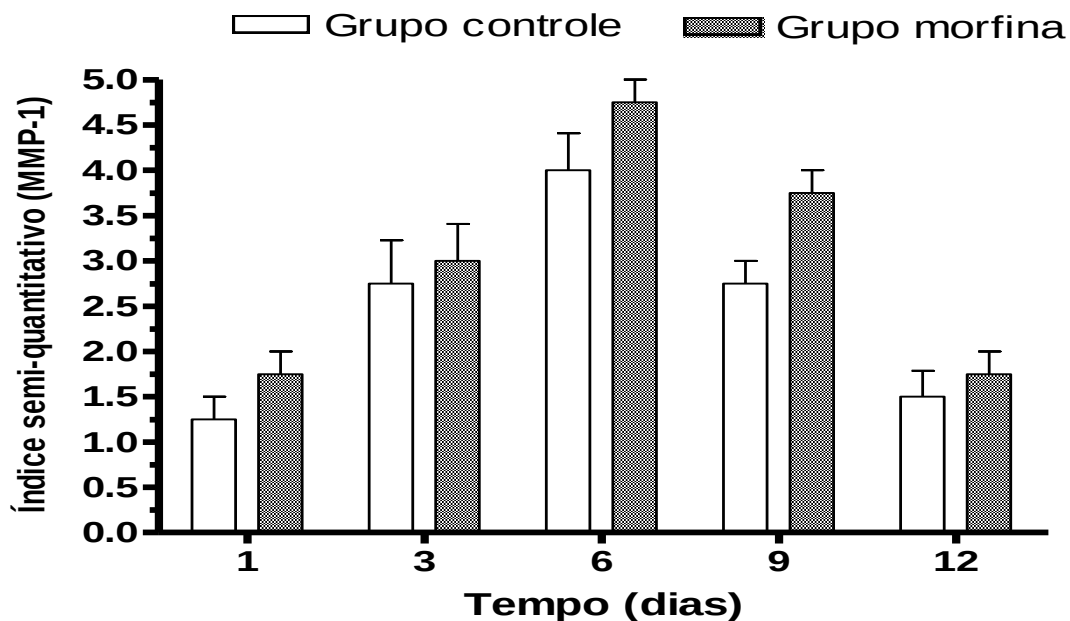


Figura 12. Valores atribuídos ao índice semi-quantitativo de imunomarcção, nos grupos controle e morfina, quanto a metaloproteinase-1, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

Teste Bonferroni ($p=1,00$)

No que concerne à MMP-9, tanto em GC quanto em GM, observou-se o mesmo padrão de marcação descrito para MMP-1, do primeiro ao terceiro dia de avaliação ($p>0,05$) (Figuras 13 e 15).

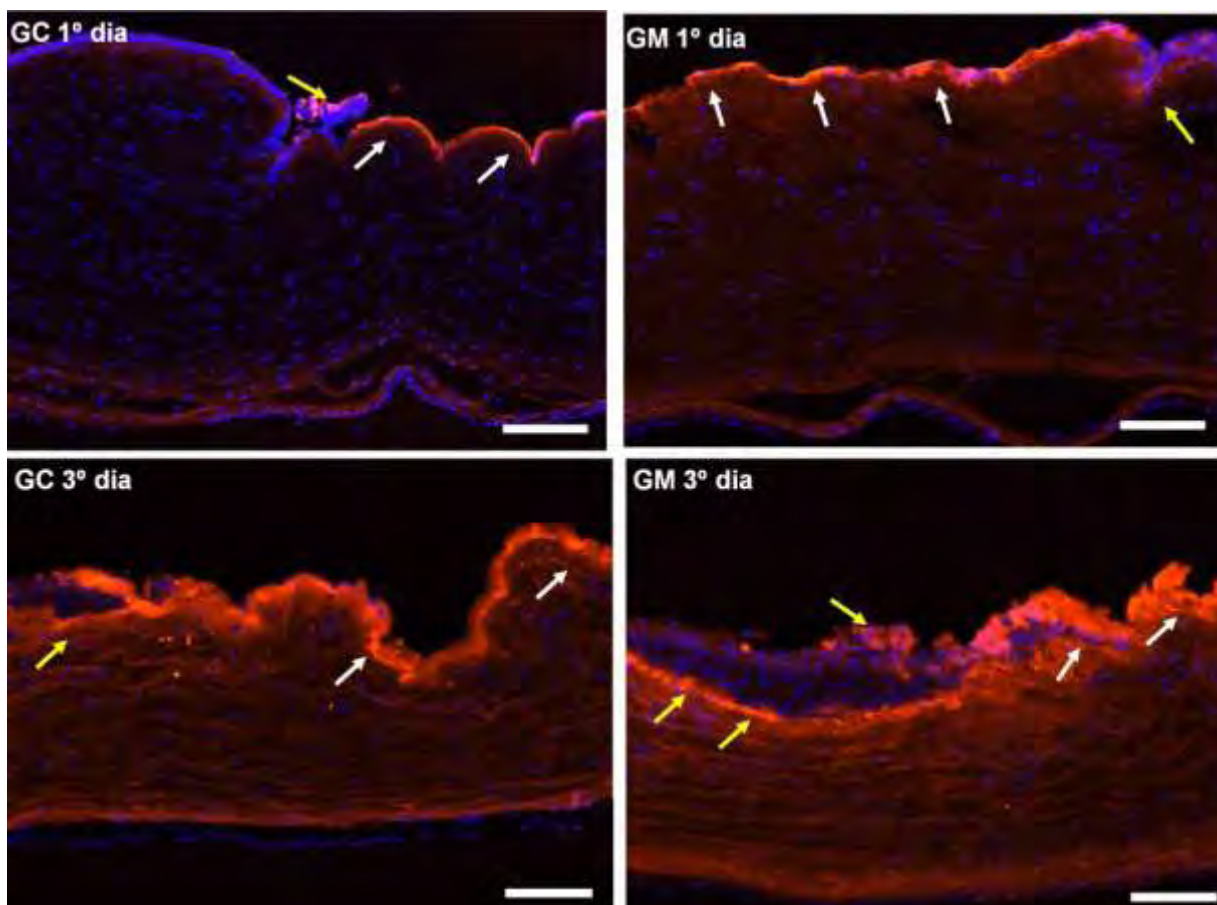


Figura 13. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9), 1 e 3 dias após as ceratectomias. Observar expressão da MMP-9 na superfície estromal da região ulcerada (setas brancas) e na região subepitelial adjacente ao leito ulcerado (setas amarelas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010. (Barra = 20µm).

Aos seis dias, 80% da região do estroma superior se apresentava imumarcada para MMP-9 em ambos os grupos ($p>0,05$) (Figuras 14 e 15). O índice de imunomarcacão atribuído    MMP-9 decresceu do nono ao décimo segundo dia, sendo que ainda, imunomarcacão em 15% da região de estroma superficial previamente ulcerada p  de ser observada no GC e, em 25% do GM ($p>0,05$) (Figuras 14 e 15).

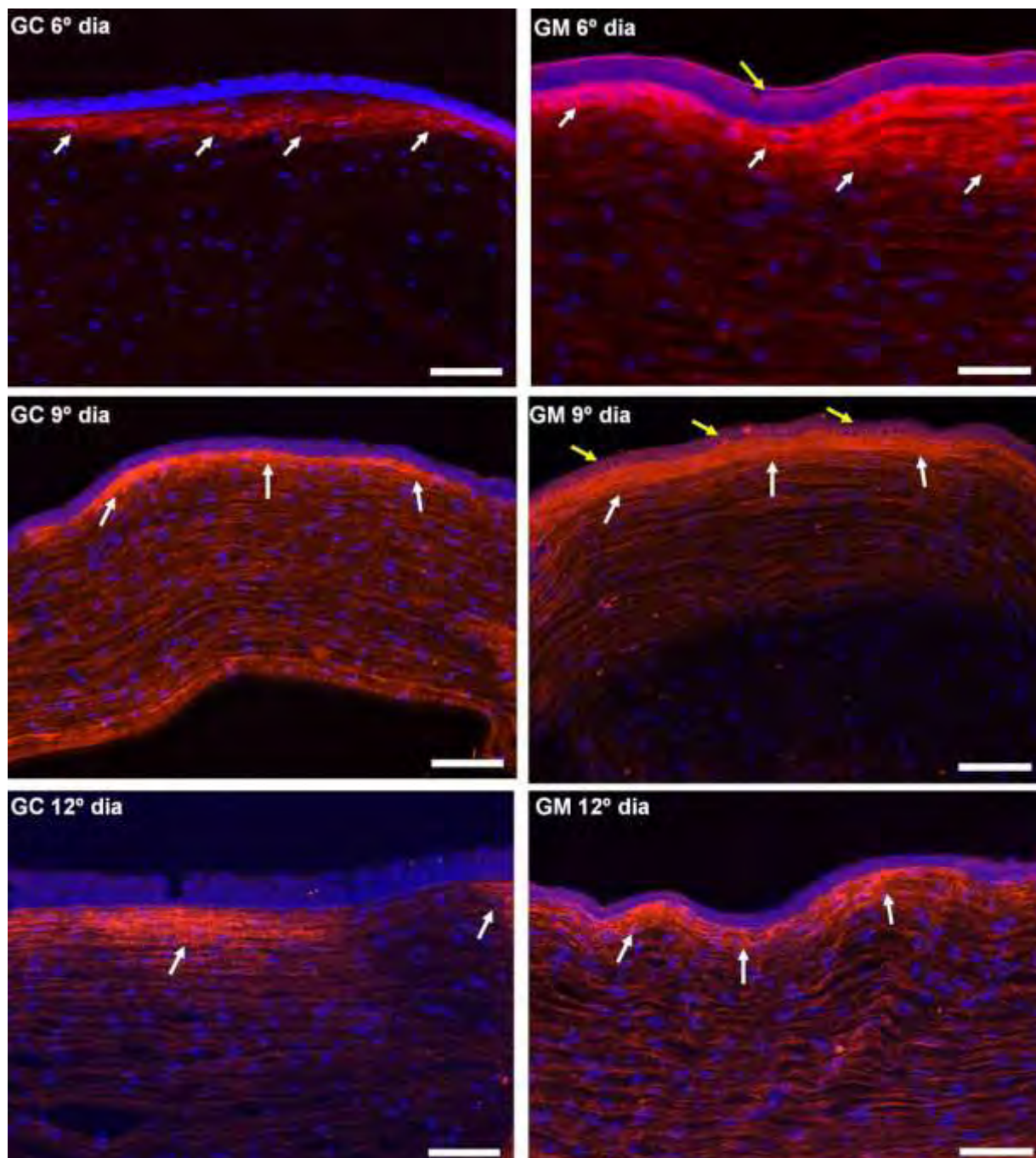


Figura 14. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9), 6, 9, e 12 dias após as ceratectomias. Observar ao sexto dia após as ceratectomias, expressão da MMP-9 na superfície estromal (setas brancas) no epitélio (setas amarelas). Ao décimo segundo dia, ainda observa-se a expressão da MMP-9, na região subepitelial (setas brancas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010. (Barra = 20µm).

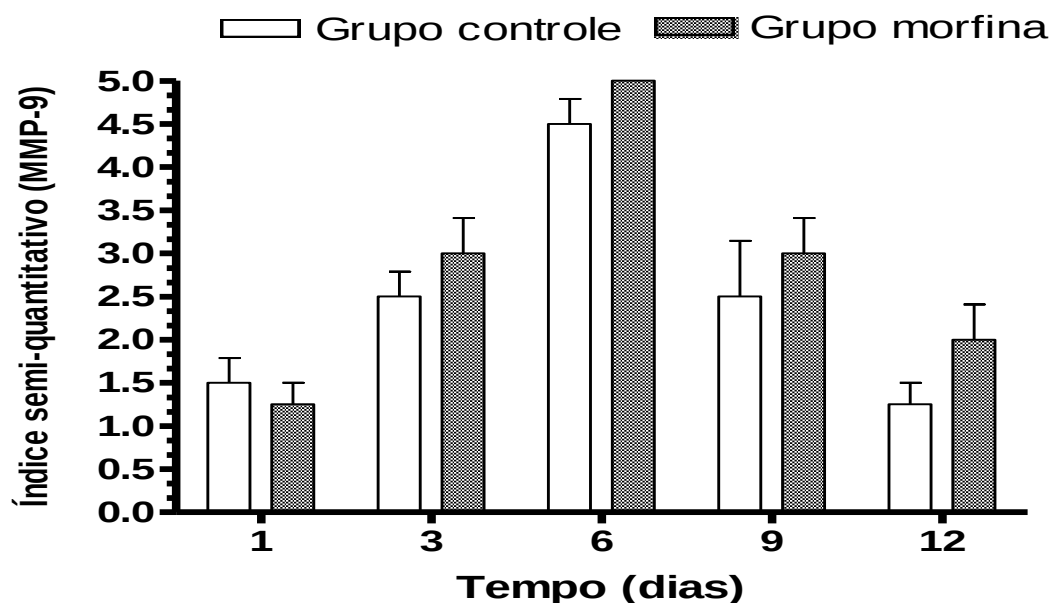


Figura 15. Valores atribuídos ao índice semi-quantitativo de imunomarcção, nos grupos controle e morfina, quanto a metaloproteinase-9, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

Teste Bonferroni ($p=1,00$)

À similitude do que fora encontrado na presente pesquisa, estudos realizados em ratos, cão e no homem com córneas lesadas por ceratectomia encontrou-se o mesmo padrão de imunomarcção para MMP-1 e para MMP-9 (FINI et al., 1996; YE & AZAR, 1998; CARTER et al., 2008). Tais achados diferem dos achados de Mulholland et al. (2005), que descreveram imunomarcção de MMPs apenas na região subepitelial. Admite-se, Mulholland et al. (2005) que no estudo de houve a participação do inibidor de protease monensina, utilizado previamente a incubação dos anticorpos, e que fora empregado com o intuito de que apenas MMPs presentes no meio intracelular fossem marcadas pelos anticorpos.

Identificou-se epitelização corneal ao sexto dia de avaliação, em 62% dos animais dos grupos controle e morfina. Mesmo assim, a MMP-1 e a MMP-9 se expressaram nos tecidos corneais, até o último período avaliado. Pela imunoistoquímica, não se observaram diferenças significativas, no índice de imunomarcção ambas MMPs avaliadas, em qualquer dos períodos estudados.

Não obstante, o índice de imunomarcacão para a MMP-1, ao 3º, 6º, e 12º dias da avaliaão foi discretamente mais elevado no estroma e no epitlio dos animais tratados com morfina; esses achados podem justificar os halos de maior diâmetro nos animais desse grupo. Tais achados não se assemelham aos obtidos em outras pesquisas, em coelhos ceratectomizados, assim como em equinos e em cães acometidos por úlceras de córnea contaminadas pela *Pseudomonas* sp. (OLLIVIER et al, 2004; MULHOLLAND et al., 2005; WANG et al., 2008).

Relativamente ao colágeno do tipo IV, no primeiro dia da avaliação, constatou-se imunomarcacão focal, em menos de 10% regiões da membrana basal da córnea não submetida à ceratectomia (10%) e em focos da membrna de Descemet, tanto em GC, quanto em GM ($p>0,05$) (Figuras 16 e 18). Ao terceiro dia, observou-se incremento de 30% na expressão do anticorpo na região subepitelial, migrando sobre o leito ulcerado, tanto no GC quanto GM ($p>0,05$) (Figuras 16 e 18).

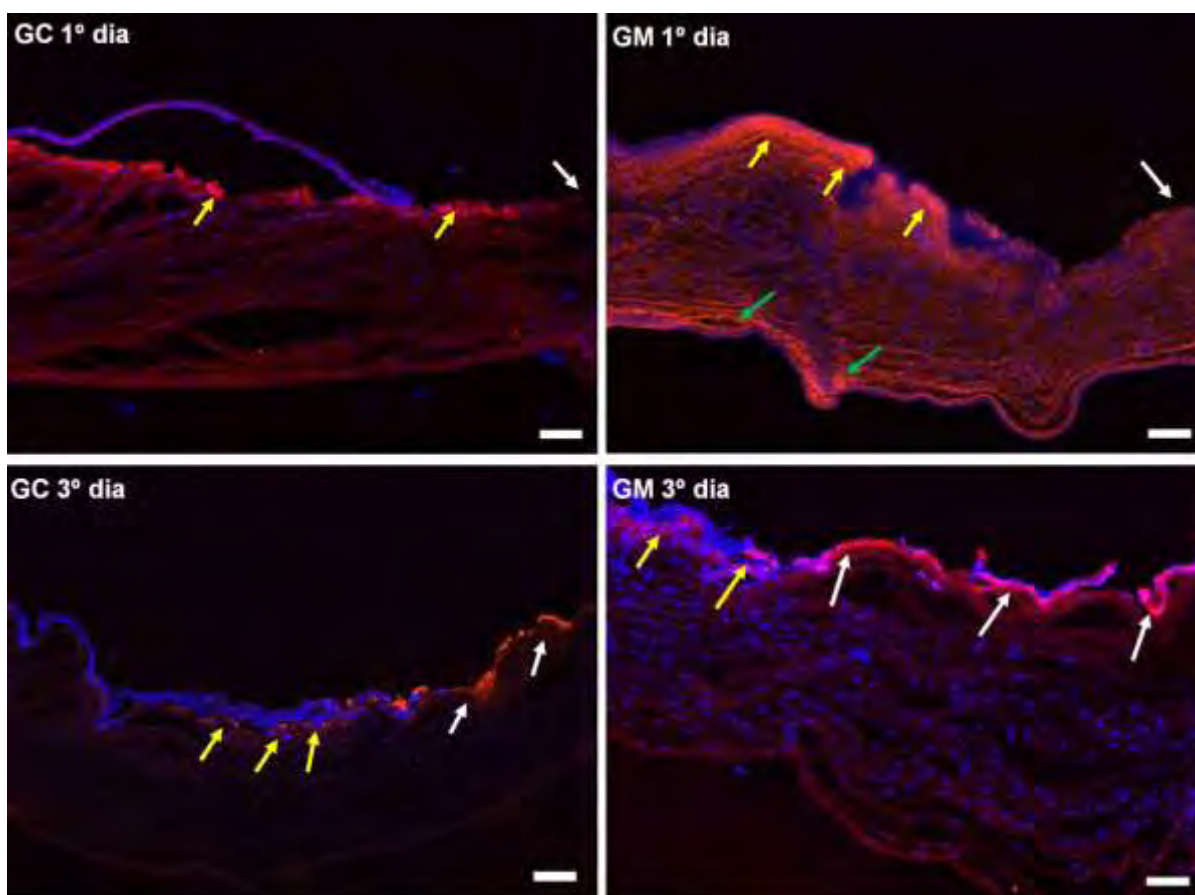


Figura 16. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, do grupo controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão do colágeno IV, 1 e 3 dias após as ceratectomias. No primeiro dia, nota-se imunomarcacão do colágeno IV na região subepitelial (setas amarelas), assim como na membrana de Descemet (setas verdes); não há imunomarcacão na região ulcerada (seta brancas). Ao terceiro dia, observa-se expressão do colágeno IV em região de membrana basal (setas amarelas) e adentrando o leito ulcerado (setas brancas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010. (Barra = 200 μ m).

Fujikawa et al. (1984) observaram que córneas saudáveis de coelhos não expressam colágeno do tipo IV. Reportou-se que a membrana basal da córnea de coelhos saudáveis não expressam as frações alfa-1 e alfa-2 do colágeno do tipo IV, apenas a alfa-5 (KATO et al., 2006). No presente estudo, utilizou-se anticorpo monoclonal, com especificidade apenas para as cadeias alfa-1 e alfa-2 do colágeno tipo IV. Kato et al. (2006) admitiram que após queimadura com álcali há substituição de constituintes da membrana basal na córnea de coelhos. A fração alfa-5 do colágeno tipo IV, responsável pela transparência corneal é substituída pelas frações alfa-1 e -2, que não se expressam em córneas saudáveis (Kato et al., 2006). Tais achados justificam o padrão de imunomarcação para o colágeno do tipo IV encontrado na presente pesquisa, que se expressou de maneira crescente ao longo dos períodos avaliados. Os achados aqui reportados, não corroboram com os de Fujikawa et al. (1984), que observaram expressão do colágeno do tipo IV, apenas 2 a 4 semanas após a confecção de ceratectomias lamelares em coelhos. Em nosso estudo, observou-se expressão focal do colágeno do tipo IV, logo ao primeiro dia de avaliação, em alguns animais, apenas na região subepitelial adjacente ao leito ulcerado.

Ao sexto dia, observou-se imunomarcação descontínua do colágeno do tipo IV, em mais de 50% da região da membrana basal, sob o epitélio recém formado, em todos os animais do GC e do GM ($p>0,05$) (Figuras 17, 18 e Tabela 7). Dos nove aos 12 dias de avaliação, 75 a 95% da região da membrana basal apresentaram-se marcados para o colágeno tipo IV, sem diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$) (Figuras 17, 18 e Tabela 7), sugerindo que o uso local de morfina não prejudicou a sua gênese.

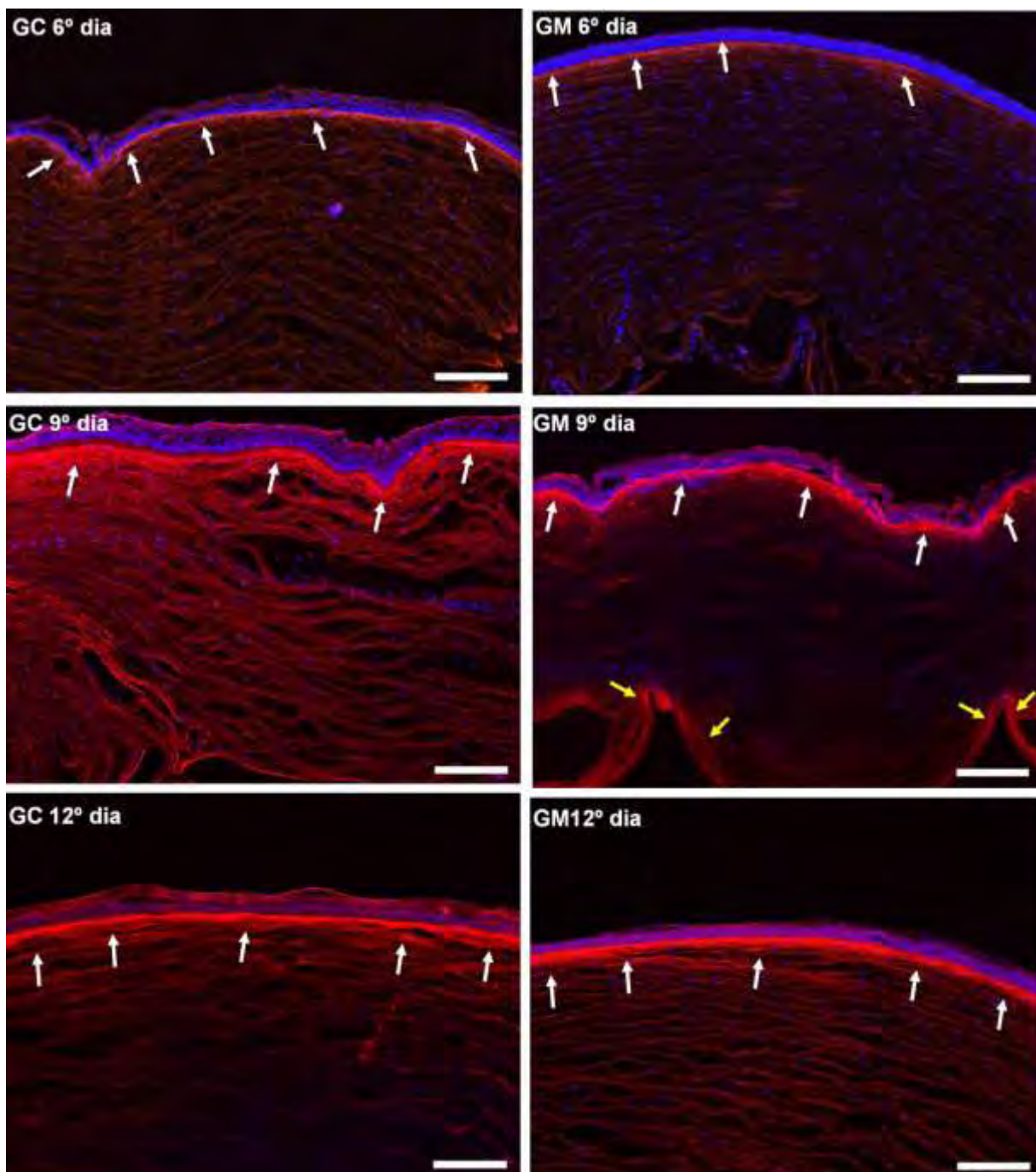


Figura 17. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, do grupo controle (GC) e morfina (GM), ilustrando a expressão do colágeno IV, 6, 9 e 12 dias, após as ceratectomias. Ao sexto dia, nota-se imunomarcagem do colágeno IV sob epitélio recém formado (setas). Doze dias após as ceratectomias, observa-se expressão intensa do colágeno IV, em região de membrana basal (setas). Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. Jaboticabal, 2010. (Barra = 20 μ m).

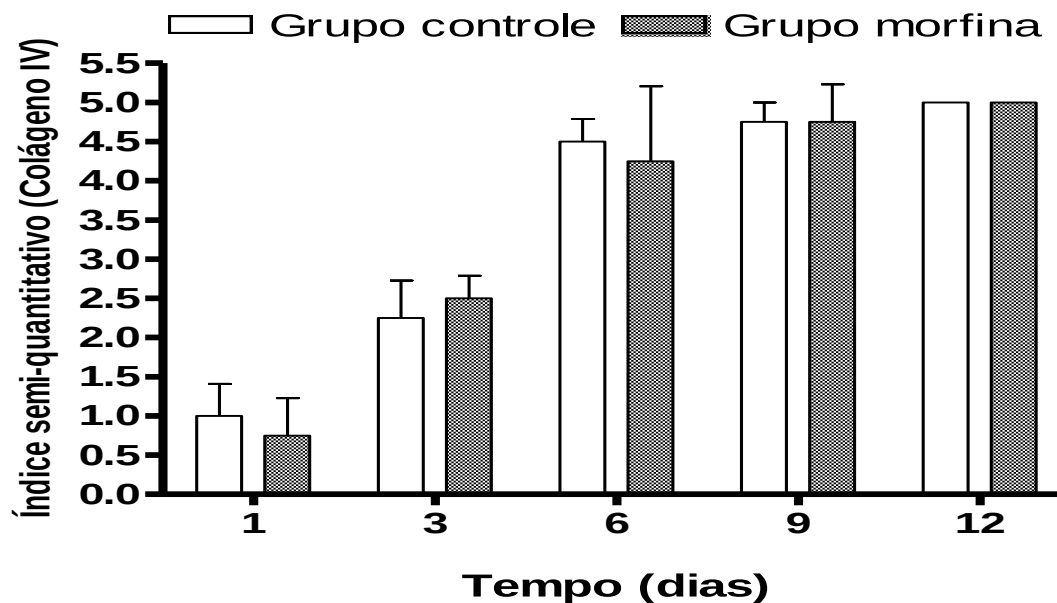


Figura 18. Valores atribuídos ao índice semi-quantitativo de imunomarcação, nos grupos controle e morfina, quanto colágeno tipo IV, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

Teste Bonferroni ($p=1,00$)

Não se observou imunomarcação nos controles negativos. Outrossim, não se observou expressão de qualquer das MMPs estudadas, em córneas saudáveis. Relativamente à expressão do colágeno do tipo IV em córneas saudáveis, constatou-se imunomarcação focal, descontínua e irregular, na região das membranas basal e de Descemet (Figura 19).

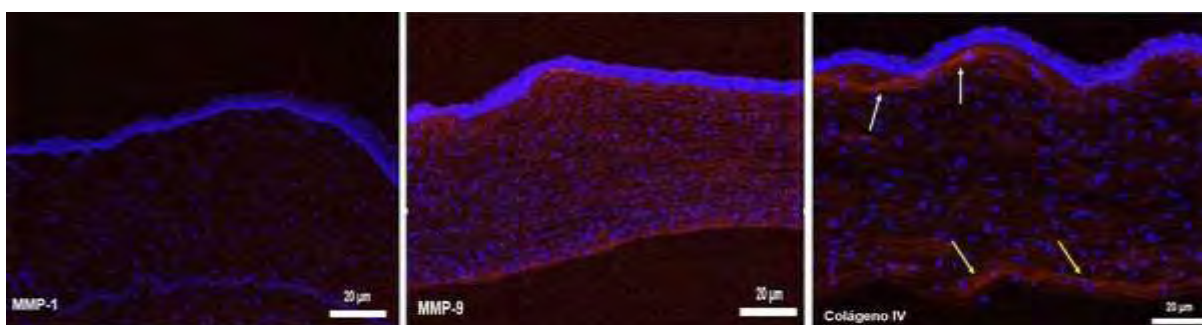


Figura 19. Tecidos corneais saudáveis de coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, incubados com os anticorpos anti-metaloproteinase-1 (MMP-1), anti-metaloproteinase-9 (MMP-9) e anti-colágeno tipo IV. Observar ausência de marcação da MMP-1 e da MMP-9. Expressão focal e descontínua do colágeno do tipo IV, na mebrana basal (setas brancas) e na membrana de Descemet (setas amarelas). Jaboticabal, 2010. Conjugado Cy3 e 4'6'-diamidino-2-fenilindol. (Barra = 20µm).

Os métodos empregados considerando as ponderações apresentadas anteriormente mostram porque em córneas saudáveis, apenas imunomarcção focal e irregular foi detectada em algumas regiões da membrana basal e na de Descemet. A não existência de imunomarcção, descrita em outros estudos, frente à marcação fraca e focal observada na presente pesquisa, pode ser atribuída à diferenças relacionadas à aos anticorpos utilizados.

4.4 Zimografia

Apenas a forma latente e a ativa da metaloproteinase-2 (MMP-2) foram observadas nos animais saudáveis (Figura 20). Após as ceratectomias, a forma latente dessa enzima se elevou em ambos os grupos, de forma significativa, até o nono dia, relativamente aos demais períodos ($p < 0,001$), sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figuras 20 e 21). Todavia, ao sexto e ao décimo segundo dia, bandas de maior densidade da forma ativa da MMP-2, foram observadas nos coelhos do GM ($p < 0,001$) (Figuras 20 e 22).

Relativamente à MMP-9 latente, bandas de maior densidade foram constatadas, aos três e seis dias após as ceratectomias, nos animais do GM, comparativamente aos do GC ($p < 0,001$) (Figuras 20 e 23). Ao sexto dia, a forma ativa dessa enzima formou bandas de maior densidade nos coelhos do GM ($p < 0,001$) (Figuras 20 e 24). Aos 12 dias, a atividade de ambas as formas da MMP-9 decresceram de forma significativa, em relação ao terceiro e ao sexto dia, no GM e no GC ($p < 0,001$) (Figuras 20 e 24).

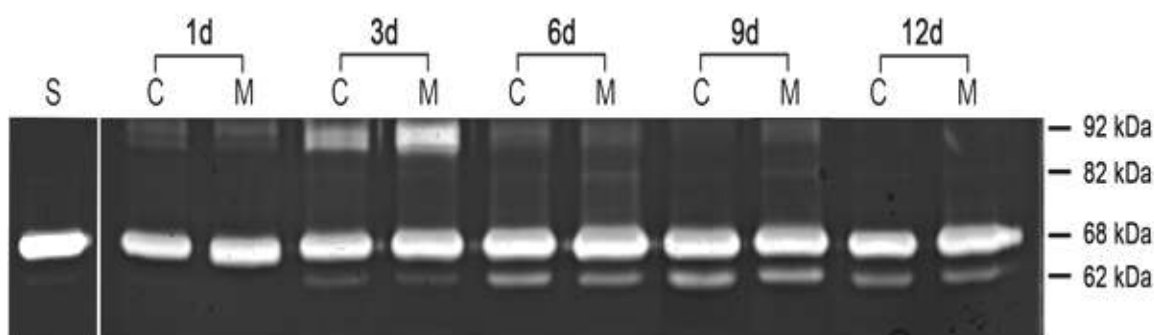


Figura 20. Gel de poliacrilamida enriquecido com gelatina demonstrando bandas de metaloproteinases (MMPs) ativas e inativas, na córnea de coelhos machos adultos saudáveis (S), do grupo controle (C) e do grupo morfina (M), decorridos 1, 3, 6, 9 e 12 dias da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

A MMP-2 e a MMP-9 são as enzimas líticas mais estudadas no âmbito da oftalmologia veterinária (STRUBBE et al., 2000; OLLIVER et al., 2007; BOVELAND et al., 2010). Diversos estudos reportam que a MMP-2 é expressa, em pequenas quantidades, em tecidos saudáveis de ratos, de cães, de equinos e de coelhos (REVIGLIO et al., 2003a; CHANDLER et al., 2008; BOVELAND et al., 2010).

Pela zimografia, bandas com peso molecular de 65 kDa (MMP-2 latente) foram identificadas na córnea de coelhos saudáveis no presente estudo. O achado demonstra a importância dessa enzima na remodelação tecidual fisiológica do tecido corneal.

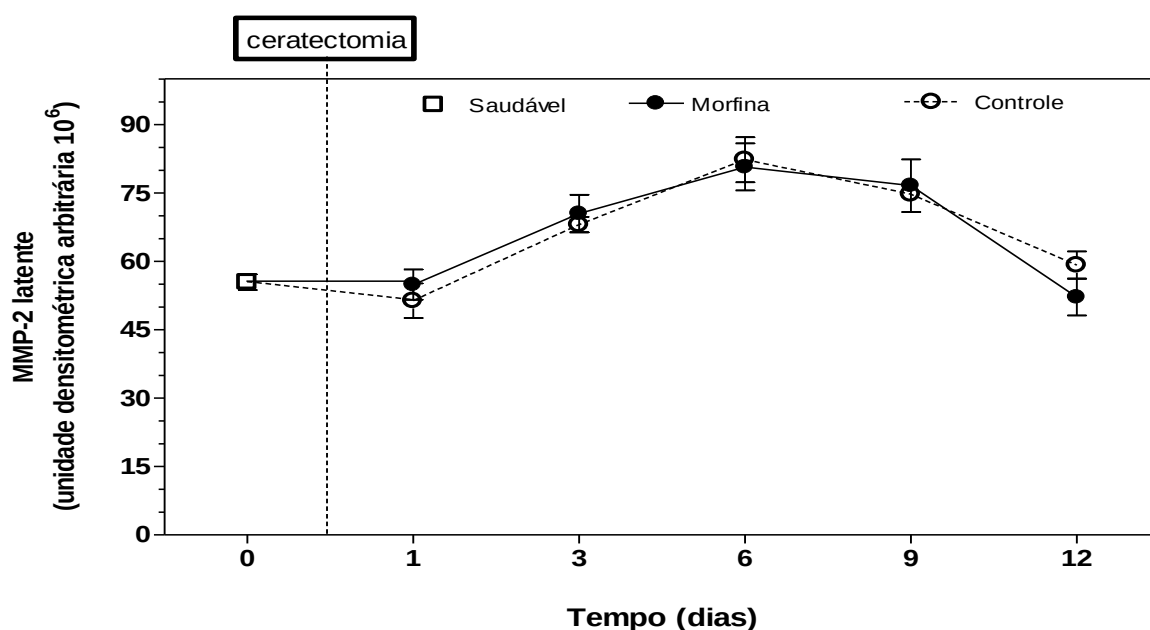


Figura 21. Concentração de MMP-2 latente, nos grupos controle e morfina, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1,3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

*Teste Bonferroni ($p < 0,001$).

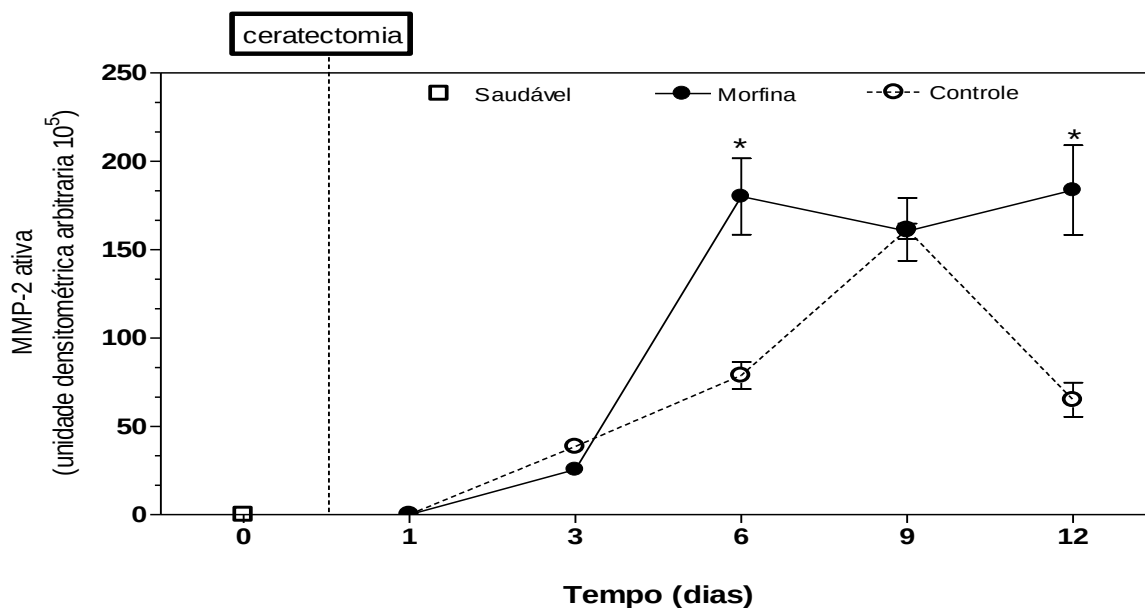


Figura 22. Concentração de MMP-2 ativa, nos grupos controle e morfina, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1,3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

*Teste Bonferroni ($p < 0,001$)

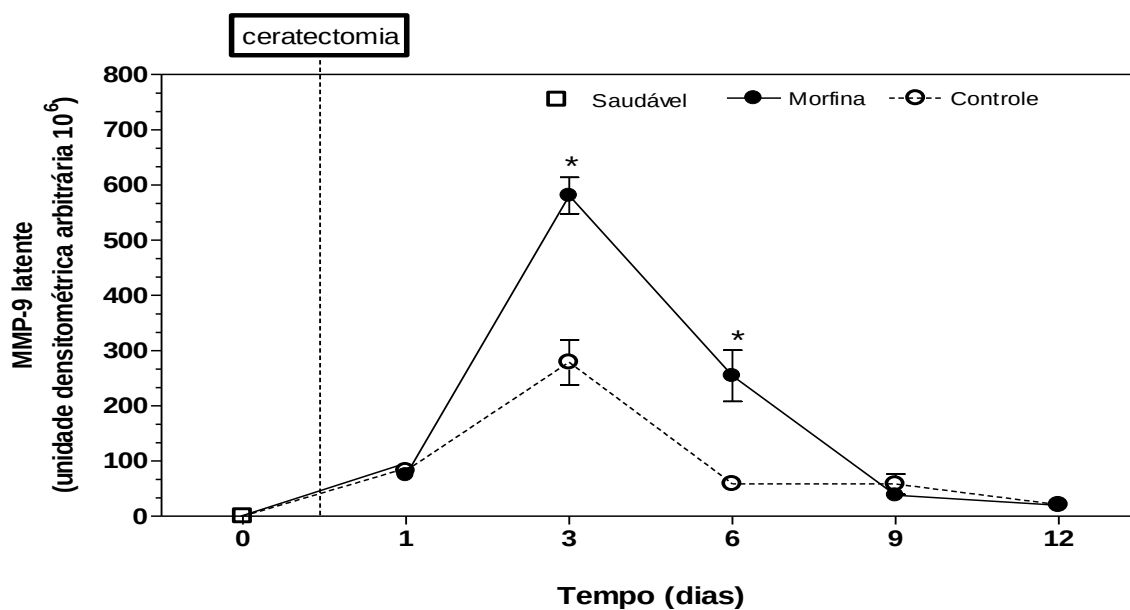


Figura 23. Concentração de MMP-9 latente, nos grupos controle e morfina, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1,3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

*Teste Bonferroni ($p < 0,001$)

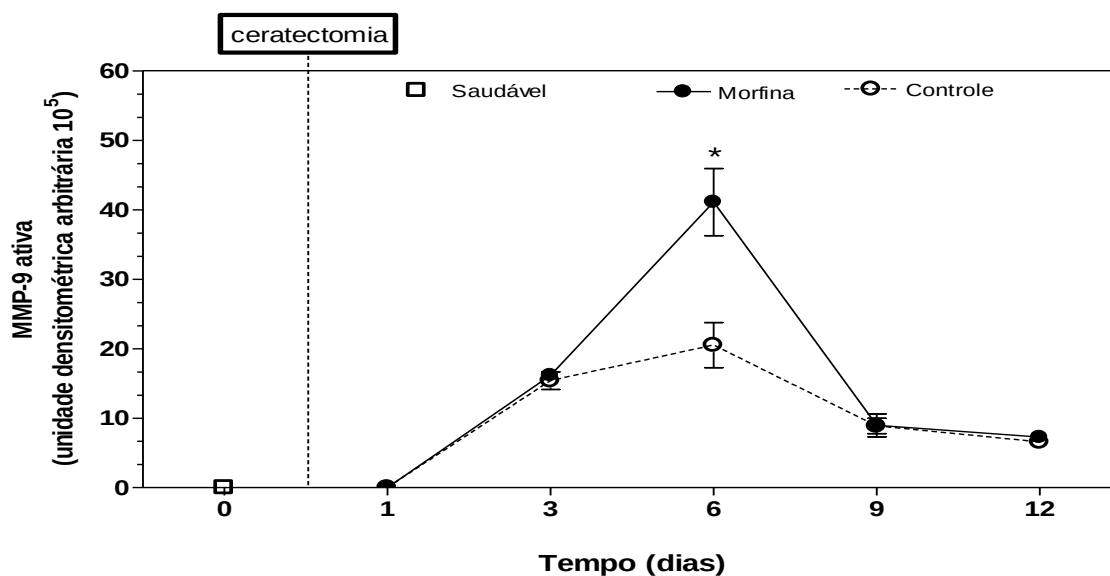


Figura 24. Concentração de MMP-9 ativa, nos grupos controle e morfina, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

*Teste Bonferroni ($p < 0,001$)

Três e seis dias após a confecção das lesões observaram-se bandas de maior densidade para a forma latente e para a forma ativa da MMP-9, assim como para a forma ativa da MMP-2, ao sexto e ao décimo segundo dia, nos animais tratados com morfina. Tais achados confirmam o que fora discutido previamente, relativamente aos halos de maior diâmetro, observados nos coelhos tratados com morfina.

Relativamente à expressão da MMP-9, os resultados obtidos à zimografia divergem daqueles demonstrados à imunoistoquímica, onde não se observaram diferenças significativas entre os grupos. Essa divergência de resultados pode ser explicada pelo fato de que na imunoistoquímica, ambas as formas, latente e ativa são reconhecidas pelo anticorpo anti-MMP-9. Ademais, na presente pesquisa, a expressão dessa enzima foi quantificada de acordo com a extensão de imunomarcacão no tecido de forma quali-quantitativa. Dessa forma, admite-se ser mais fidedigno quantificar a atividade de MMPs pela zimografia, que pela imunoistoquímica, visto que a primeira metodologia separa as formas ativa e inativa dessas enzimas em bandas, permitindo mensurar a atividade de forma numérica (BOVELAND et al., 2010).

Quantificação da MMP-1 pode também ser feita pela técnica de zimografia, através da substituição da gelatina presente no gel de poliacrilamida, pela caseína (SNOEK-van BEURDEN & VON den HOFF, 2005). Não obstante, essa técnica é bem menos sensível que aquela feita com gelatina, além de permitir que as bandas formadas, migrem para a periferia do gel, dificultando a sua quantificação (SONEK-van BEURDEN & VON den HOFF, 2005). Na presente pesquisa, tentou-se quantificar a atividade da MMP-1 pela técnica de *ELISA*. Todavia, não foram logrados resultados fidedignos, pois as córneas ulceradas apresentaram a mesma densidade óptica das córneas saudáveis.

Como na imunoistoquímica, pela zimografia observou-se redução das atividades latente e ativa da MMP-9 aos 12 dias. Os achados sugerem que inibidores teciduais de metaloproteinases controlaram a degradação excessiva da matrix extracelular em córneas ceratectomizadas. No mesmo período, entretanto, as formas latente e ativa da MMP-2, ainda eram observadas, ratificando a importância da enzima na reparação tecidual tardia, mesmo na ausência de lesão tecidual (MULHOLLAND et al., 2005). Demonstrou-se que metaloproteinases podem permanecer ativas por vários anos na córnea de seres humanos submetidos à cirurgias refrativas e estão associadas com baixo índice de complicações (FOURNIÉ et al., 2008).

4.5 Imunoensaio ligado à enzima (*ELISA*)

Observou-se entre os grupos, ao 1º dia de avaliação, redução não significativa de 62,32% (GC) e de 46,23% (GM) nos níveis de IL-10, comparativamente às córneas saudáveis ($p=0.10$) (Figura 25). Embora tenha se observado tendência de retorno aos valores basais, ao 12º dia, não se verificou significância estatística entre os grupos, em qualquer dos períodos avaliados (Figura 25).

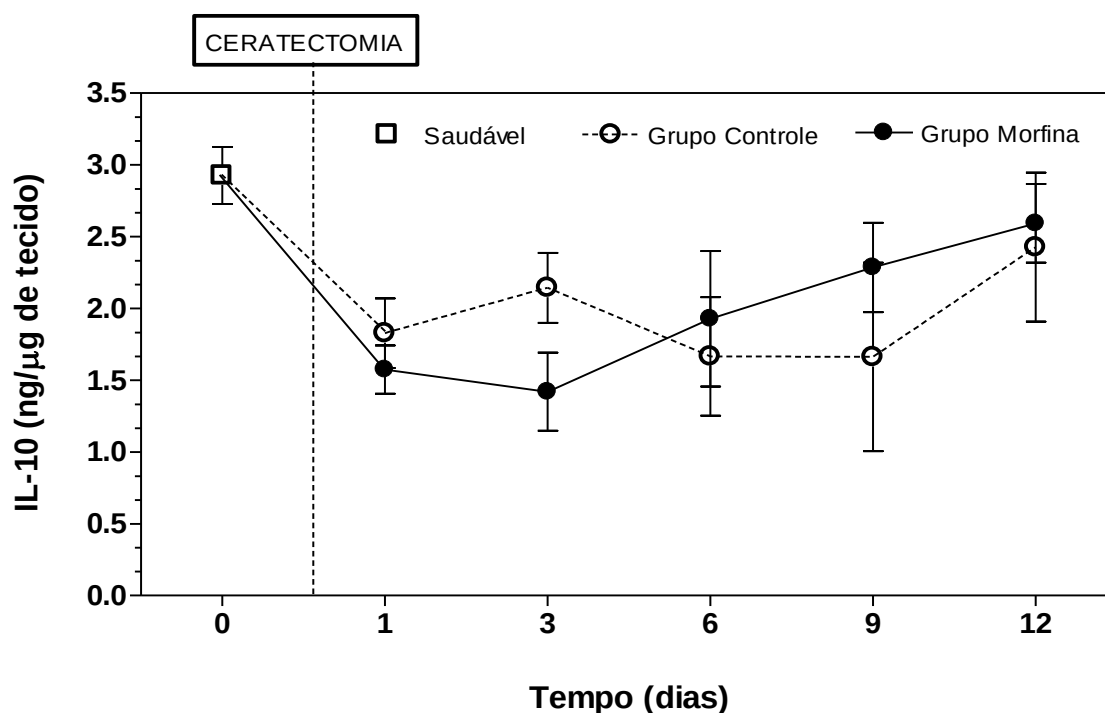


Figura 25. Concentração de Interleucina-10 (IL-10) (nanograma de IL-10/micrograma de tecido), nos grupos controle e morfina, na córnea coelhos machos adultos, da raça Nova Zelândia Branco, mensurada em géis de poliacrilamida, antes (dia 0) e após 1, 3, 6, 9 e 12 dias da realização da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2010.

Análise de Variância de Via Única ($p=0,10$).

Reconhece-se a IL-10 como a principal citocina antiinflamatória e homeostática (CAO et al., 2002; CRUZ et al., 2007; OH et al., 2008). Admite-se que sua expressão encontra-se elevada em córneas em reparação, onde o controle da inflamação é mais eficaz (CAO et al., 2002; CRUZ et al., 2007; OH et al., 2008). Demonstrou-se que a IL-10 estimula a síntese de inibidores teciduais de MMPs no tecido subcutâneo (YE et al., 2010). Em baixas concentrações, a instilação corneal de IL-10, estimula a reepitelização corneal (CARRINGTON et al., 2006).

Reportou-se que o fator de crescimento e transformação beta e a IL-1 atuam em conjunto, favorecendo a expressão de MMP-9 em córneas de coelhos (GORDON et al., 2009). Outro estudo também demonstrou que a IL-10 apresenta efeito oposto ao fator de crescimento e transformação beta, no que tange a reparação corneal (CARRINGTON et al., 2006). Relativamente aos níveis de IL-10, mesmo que sem significância estatística, os resultados

mostraram que os níveis corneais dessa citocina foram menores do primeiro ao sexto dias, retornando a valores próximos do das córneas saudáveis, ao décimo segundo dia. Supõe-se que ocorreu consumo dessa citocina, no intuito de bloquear a expressão de outras citocinas inflamatórias envolvidas na sinalização da MMP-9, uma vez que córneas em processo de reparação apresentam expressão gênica aumentada para receptores de IL-10 (CAO et al., 2002; GORDON et al, 2009, YE et al., 2010). Tais resultados sugerem que, a despeito do tratamento instituído, as córneas de ambos os grupos tenderam a restabelecer a sua homeostase.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com a pesquisa, na forma como ela fora concebida, é factível admitir que o sulfato de morfina 1% promoveu analgesia por até quatro dias, pós ceratectomias, sem retardar a epitelização corneal. A elevação do quantitativo das metaloproteinases-1, -2 e -9, em córneas tratadas com morfina 1%, não contraindica o seu uso, uma vez que os níveis teciduais dessas enzimas e da IL-10 tenderam a se normalizar ao final do estudo. A expressão do colágeno IV na membrana basal de ambos os grupos, permite também admitir que, com cautela, a morfina 1% sem preservativo poderia ser utilizada após ceratectomia lamelar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LITCHTMAN, A.H. Cytokines. In:_____. **Cellular and molecular immunology**. 5 ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p.243-274.

AGRAWAL, V.B.; TSAI, R.J. Corneal epithelial wound healing. **Indian Journal of Ophthalmology**, v.51, n.1, p.5-15, 2003.

AQUINO, S.; van der WOERDT, A.; EATON, J.S. The effect of topical nalburphine on corneal sensitivity in normal canine eyes. Abstracts: 36th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Nashville, TN, USA, October 12–15, 2005. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n.6, p.437-450, 2005.

ALAVI-NAINI R. Topical morphine for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Medical Hypotheses**, v.70, n.1, p.81-84, 2008.

ALBERTI, M.M.; BOUAT, C.G.; ALLAIRE, C.M.; TRINQUAND, C.J. Combined endomethacin/gentamicin eye drops to reduce pain after traumatic corneal abrasion. **European Journal of Ophthalmology**, v.11, n.3, p.233-239, 2001.

ANTONIJEVIC, I.; MOUSA, S.A.; SCHAEFER, M.; STEIN, C. Perineural defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. **Journal of Neuroscience**, v.15, n.1, p.165-172, 1995.

AQUILANTE, C.L.; LETRENT, S.P.; POLLACK, G.M.; BROUWER, K.L. Increased brain P-glycoprotein in morphine tolerant rats. **Life Sciences**, v.66, n.4, PL47-PL51, 2000.

ASHFIELD, T. The use of topical opioids to relieve pressure ulcer pain. **Nursing Standard**, v.19, n.45, p.90-92, 2005.

AZAR, D.T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 104, p.264-302, 2006.

BELMONTE, C.; ACOSTA, M.C.; GALLAR, J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. **Experimental Eye Research**, v.78, n.3, p.513-525, 2004.

BENTLEY, E.; ABRAMS, G.A.; COVITZ, D.; COOK, C.S.; FISCHER, C.A.; HACKER D; STUHR, C.M.; REID, T.W.; MURPHY, C.J. Morphology and Immunohistochemistry of Spontaneous Chronic Corneal Epithelial Defects (SCCED) in Dogs. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.42, n.10, p.2262-2269, 2001.

BENTLEY, E.; MURPHY, C.J. Topical therapeutic agents that modulate corneal wound healing. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.623-638, 2004.

BLOCKER, T.; HOFFMAN, A.; SCHAEFFER, D.J.; WALLIN, J.A. Corneal sensitivity and aqueous tear production in dogs undergoing evisceration with intraocular prosthesis placement. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n.3, p.147-154, 2007.

BOVELAND, D.B.; MOORE, P.A.; MYSORE, J.; KRUNKOSKY, T.M.; DIETRICH, U.M.; JARRET, C.; CARMICHAEL, K.P. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases-2 and -9, macrophage inflammatory protein-2 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and -2 in normal, purulonecrotic and fungal infected equine corneas. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.2, p.81-90, 2010.

BORKOWISKI, R.; KARAS, A. Sedation and anesthesia for pet rabbits. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.14, n.1, p.44-49, 1999.

BRODIN, E.; GAZELIUS, B.; PANOPOLUS, P.; OLGART, L. Morphine inhibits substance P release from peripheral sensory nerve endings. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.117, n.4, p.567-570, 2008.

BROOKS, D.E.; OLLIVER, F.J. Matrix metalloproteinase inhibition in corneal ulceration. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.611-622, 2004.

BROWN, S.M.; LAMBERTS, D.W.; REID, T.W.; NISHIDA, T.; MURPHY, C.J. Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and insulinlike growth factor-1. **Archives of Ophthalmology**, v.115, n.7, p.926-927, 1997.

CAMERON, J.D.; SKUBITZ, A.P.; FURCHT, L.T. Type IV collagen and corneal epithelial adhesion and migration. Effects of type IV collagen fragments and synthetic peptides on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration in vitro. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.32, n.43, p.2766-2773, 1991.

CAO, Z.; WU, H.K.; BRUCE, A.; WOLLENBERG, K.; PANJWANI, N. Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.43, n.9, p.2897-2904, 2002.

CARTER, R.T.; KAMBAMPATI, R.; MURPHY, C.J.; BENTLEY, E. Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in experimentally wounded canine corneas and spontaneous chronic corneal epithelial defects. **Cornea**, v.26, n.10, p.1213-1219, 2007.

CARRINGTON, L.M.; ALBON, J.; ANDERSON, I.; KAMMA, C.; BULTON, M. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.47, n.5, p.1886-1894, 2006.

CHANDLER, H.L.; KUSEWITT, D.F.; COLITZ, C.M. Modulation of matrix metalloproteinases by ultraviolet radiation in the canine cornea. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.3, p.135-144, 2008.

CHO, H.I.; COVINGTON, H.I.; CINTRON, C. Immunolocalization of type IV collagen in developing and healing rabbit cornea. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v.31, n.6, p.1096–1102, 1990.

CHOI, Y.; CHUANG, L.F.; LAM, K.M.; KUNG, H.F.; WANG, J.M.; OSBURN, B.I.; CHUANG, R.Y. Inhibition of chemokine-induced chemotaxis of monkey leukocytes by m-opioid receptor agonists. **In Vivo**, v.13, n.5, p.389–396, 1999.

CLARK, J.D.; SHI, X.; LI, X.; QIAO, Y.; LIANG, D.; ANGST, M.S.; YEOMANS, D.C. Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. **Molecular Pain**, v.2, n.3, p.28-39, 2007.

CLARK, J.S.; BENTLEY, E.; SMITH, L.J. Topical nalbuphine or oral tramadol as analgesics for corneal pain in dogs: a pilot study. 40th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists, Chicago, IL, USA, 4 a 7 de novembro, 2009. **Veterinary Ophthalmology**, v.12, n.6, p.396, 2009.

CONCEIÇÃO, L.F. **Efeitos do ceterolaco de trometamina 0,5%, sem preservativo, em coelhos submetidos à abrasão química com hidróxido de sódio**. 2010. 57f. Dissertação (Mestre em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CZLONKOWSKI, A.; STEIN, C.; HERZ, A. Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. **European Journal of Pharmacology**, v.242, n.3, p.229-235, 1993.

CRUZ, R.; QUINTANA-HAU, J.D.; GONZÁLEZ, J.R.; TORNERO-MONTAÑO, R.; BAIZA-DURÁN, L.M.; VEJA, L. Effects of an ophthalmic formulation of meloxicam on COX-2 expression, PGE2 release, and cytokine expression in a model of acute ocular inflammation. **British Journal of Ophthalmology**, v.92, n.1, p.120-125, 2007.

CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A.; MCCARVILLE, C. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.4, p.215-224, 2005.

DANIELS, J.T.; GEERLING, G.; ALEXANDER, R.A.; MURPHY, G.; KHAW, P.T.; SAARIALHO-KERE, U. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue. **Experimental Eye Research**, v.77, n.6, p.653-64, 2003.

EPSTEIN, S.P.; AHDOOT, M.; MARCUS, E.; ASBELL, P.A. Comparative Toxicity of Preservatives on Immortalized Corneal and Conjunctival Epithelial Cells. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.25, n.2, p.1113-119, 2009.

DEY, S.; PATEL, J.; ANAND, B.S.; JAIN-VAKKALAGADDA, B.; KALIKI, P.; PAL, D.; GANAPATHY, V.; MITRA, A.K. Molecular evidence and functional expression of P-glycoprotein (MDR1) in human and rabbit cornea and corneal epithelial cell lines. **Investigative Ophthalmology and Visual Sciences**, v. 44, n.7, p.2909-2918, 2003.

FAKTOROVICH, E.G.; BASBAUM, A.I. Effect of topical 0.5% morphine on postoperative pain after photorefractive keratectomy. **Journal of Refractive Surgery**, v.25, (prelo), p.1-8, 2010.

FINI, M.E.; PARKS, W.C.; RINEHART, W.B.; GIRARD, M.T.; MATSUBARA, M.; COOK, J.R.; WEST-MAYS, J.A.; SADOW, P.M.; BURGESSON, R.E.; JEFFREY, J.J.; RAIZMAN, M.B.; KRUEGER, R.R.; ZIESKE, J.D. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. **American Journal of Pathology**, v.149, n.4, p.1287-1302, 1996.

FOURNIÉ, P.R.; GORDON, G.M.; DAWSON, D.G.; EDELHAUSER, H.F.; FINI, M.E. Correlations of long-term matrix metalloproteinase localization in human corneas after successful laser-assisted in situ keratomileusis with minor complications at the flap margin. **Archives of Ophthalmology**, v.126, n.2, p.162-170, 2008.

FUJIKAWA, L.S.; FOSTER, C.S.; GIPSON, I.K.; COLVIN, R.B. Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies. **Journal of Cell Biology**, v.98, n.1, p.128-138, 1984.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; KIM, H.J. Effect of Leukocytes on Corneal Cellular Proliferation and Wound Healing. **Investigative Ophthalmology and Visual Sciences**, v.40, n. 3, 1999.

GAO, J.; SIEMASKO, K.F.; VU, C. Effect of the 4th generation fluoroquinolone on rabbit corneal wound healing. **Presented at the Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Proceedings...** April 25–29, 2004, Fort Lauderdale, FL.

GOLDIM, J.R. **Pesquisa em saúde e direito dos animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28p.

GORDON, G.M.; LEDEE, D.R.; FEUER, W.J.; FINI, M.E. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. **Journal of Cell Physiology**, v.221, n.2, p.402-411, 2009.

GOOD, K.; MAGGS, D.J.; HOLLINGSWORTH, S.R.; SCAGLIOTTI, R.H.; NELSON, R.W. Corneal sensitivity in dogs with diabetes mellitus. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.1, p.7-11, 2003.

GUIDERA, A.C.; LUCHS, J.L.; UDEL, L.J. Keratitis, ulceration and perforation associated with topical nosteroidal anti-inflammatory drugs. **Ophthalmology**, v.108, n.5, p.936-944, 2001.

GUO, Y.; SATPATHY, M.; WILSON, G.; SRINIVAS S.P. Benzalkonium chloride induces dephosphorylation of myosin light chain in cultured corneal epithelial cells **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.48, n.5, p.2001-2008, 2007.

HENDRIX, D.V.H.; WARD, D.A.; BARRNHILL, M.A. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.10, p.1664-1669, 2001.

HENDRIX, D.V.; WARD, D.A.; BARRNHILL, M.A. Effects of anti-inflammatory drugs and preservatives on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. **Veterinary Ophthalmology**, v.5, n.2, p.127-135, 2002.

KAPS, S.; RICHTER, M.; SPIESS, B.M. Corneal estesiometria in the healthy horse. **Veterinary Ophthalmology**, v.6, n.2, p.151-155, 2003.

LEE, C.H.; WHITEMAN, A.L.; MURPHY, C.J.; BARNEY, N.P.; TAYLOR, P.B.; REID, T.W. Substance P, insulinlike growth factor 1, and surface healing. **Archives of Ophthalmology**, v.120, n.2, p.215-217, 2002.

KATO, T.; SAIKA, S.; OHNISHI, Y. Effects of the matrix metalloproteinase inhibitor GM6001 on the destruction and alteration of epithelial basement membrane during the healing of post-alkali burn in rabbit cornea. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.50, n.2, p.90-5, 2006.

KAWASAKI, Y.; XU, Z.Z.; WANG, X.; PARK, J.Y.; ZHUANG, Z.Y.; TAN, P.H.; GAO, Y.J.; ROY, K.; CORFAS, G.; LO, E.H.; JI, R.R. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. **Nature Medicine**, v.14, n.3, p.331-336, 2008.

KINGSLEY, R.E; MARFURT, C.F. Topical substance P and corneal epithelial wound closure in the rabbit. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.38, n.2, p.388-395, 1997.

KOCK, T.; HÖLLT, V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. **Pharmacology and Therapeutics**, v.117, n.2, p.199-206, 2008.

ZÖLLNER, C.; MOUSA, S.; KLINGER, A.; FÖRSTER, M.; SCHÄFER, M. Topical fentanyl in a randomized, double-blind study in patients with corneal damage. **Clinical Journal of Pain**, v.24, n.8, p.690-696, 2008.

LEDBETTER, E.C.; MUNGER, R.J.; RING, R.D.; SCARLETT, J.M. Efficacy of two chondroitin sulfate ophthalmic solutions in the therapy of spontaneous chronic corneal epithelial defects and ulcerative keratitis associated with bullous keratopathy in dogs **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.2, p.77-78, 2006.

LEONARDI, A.; BRUN, P.; ABATANGELO, G. et al. Tear levels and activity of matrix metalloproteinases (MMP-1) nad MMP-9 in vernal keratoconjunctivitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.44, n.7, p.3052-3058, 2003.

LI, Z.; BURNS, A.R.; SMITH, C.W. Two Waves of Neutrophil Emigration in Response to Corneal Epithelial Abrasion: Distinct Adhesion Molecule Requirements. **Investigative Ophthalmology and Visual Sciences**, v.47, n.5, p.1947-1955, 2006.

LIN, M.; JACKSON, P.; TESTER, A.M.; DIACONU, E.; OVERALL, C.M.; BLALOCK, J.E.; PEARLMAN, E. Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro. **American Journal of Pathology**, v.173, n.1, p.144-53, 2008.

LIN, J.C. RAPUANO, C.J.; LAISBONP, R.; EAGLE, R.C.Jr.; COHEN, E.J. Corneal melting associated with the use of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs after ocular surgery. **Archives of Ophthalmology**, v118, n.8, p.1129-1132, 2000.

LIU, Y.; BLACKBOURN, D.J.; CHUANG, L.F. Jr.; CHUANG, R.Y. Effects of in vivo and in vitro administration of morphine sulfate upon Rhesus Macaque polymorphonuclear cell phagocytosis and chemotaxis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.263, n.2, p.533–539, 1992.

MARFURT, C.F.; MURPHY, C.J.; FLORCKZAC, J.L. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** , v.42, n.10, p.2242-2251, 2001.

MARTIN, J.L.; KOODIE, L.; KRISHNAN, A.G.; CHARBONEAU, R.; BARKE, R.A.; ROY, S. Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. **American Journal of Pathology**, v.176, n.2, p.786-799, 2010.

McDERMOTT, M.; WHEATER, M. In vitro comparison of the effects of clinically available ophthalmic solutions of gatifloxacin 0.3% and moxifloxacin 0.5% on human corneal and conjunctival epithelial cell adhesion and migration and on collagen type IV protein expression. **Cornea**, v.25, n.9, S22-S25, 2006.

MICHELACCI, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.8, p.1037-1046, 2003.

MOREIRA, L.B.; KASETSUWAN, N.; SANCHEZ, D.; SHAH, S.S.; LABREE, L.; McDONNELL, P.J. Toxicity of topical anesthetic agents to human keratocytes in vivo. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v.25, n.7, p.975-980, 1999.

MÜLLER, L.J.; MARFURT, C.F.; KRUSE, F.; TERVO, T.M. Corneal nerves: structure, contents and function. **Experimental Eye Research**, v.76, n.5, p.521-542, 2003.

MULHOLLAND, B.; TUFT, S.J.; KHAW, P.T. Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing. **Eye**, v.19, n.5, p.584-588, 2005.

MURPHY, C.J.; MARFURT, C.F.; McDERMOTT, A. BENTLEY, E.; ABRAMS, G.A.; REID, T.W.; CAMPBELL, S. Spontaneous chronic epithelial defects (SCCED) in dogs: clinical features, innervation, and effect of topical SP, with or without IGF-1. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.42, n.10, p.2252-2261, 2001.

NISHIDA, T.; NAKAMURA, M.; KONMA, T.; OFUJI, K.; NAGANO, K.; TANAKA, T.; ENOKI, M.; REID, T.W.; BROWN, S.M.; MURPHY, C.J.; MANNIS, M.J. Neurotrophic keratopathy--studies on substance P and the clinical significance of corneal sensation. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**, v.101, n.12, p.948-974, 1997.

OKURA, T.; OZAWA, T.; IBE, M.; TAKI, Y.; KIMURA, M.; KAGAWA, Y.; KATO, Y.; YAMADA, S. Effects of repeated morphine treatment on the antinociceptive effects, intestinal absorption, and efflux from intestinal epithelial cells of morphine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.32, n.9, p.1571-1575, 2009.

OH, J.Y.; KIM, M.K.; SHIN, M.S.; LEE, H.J.; KO, J.H.; WEE, W.R.; LEE, J.H. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. **Stem Cells**, v.26, n.4, p.1047-1055, 2008.

OLLIVIER, F.J.; GILGER, B.C.; BARRIE, K.P.; KALLBERG, M.E.; PLUMMER, C.E.; O'REILLY, S.; GELATT, K.N.; BROOKS, D.E. Proteinases of the cornea and precorneal tear film. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n.4, p.199-206, 2007.

PERLOFF, M.D.; VON MOLTKE, L.L.; MARCHAND, J.E.; GREENBLATT, D.J. Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, n.11, p.1829-1837, 2001.

PEYMAN, G.A.; RAHIMY, M.H.; FERNANDES, M.L. Effects of morphine on corneal sensitivity and epithelial wound healing: implications for topical ophthalmic analgesia. **British Journal of Ophthalmology**, v.78, n.2, p.138-141, 1994.

PRUETT, S.B.; HAN, Y.; FUCHS, B.A. Morphine suppresses primary humoral immune responses by a predominantly indirect mechanism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.262, n.3, p. 923-928, 1992.

REVIGLIO, V.E.; RANA, T.S.; LI, Q.J.; ASHRAF, M.F.; DALY, M.K.; O'BRIEN, T.P. Effects of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the expression of

matrix metalloproteinases in the cornea. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**; v.29, n.5, p.989–997, 2003a.

REVIGLIO, V.E.; HAKIM, M.A.; SONG, J.K.; O'BRIEN, T.P. Effect of topical fluoroquinolones on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. **BMC Ophthalmology**, v.3, p.10-17, 2003b.

RIBEIRO, M.D.; JOEL, S.P.; ZEPPELELLA, G. The bioavailability of morphine applied topically to cutaneous ulcers. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.27, n.5, p.434-439, 2004.

ROBERTSON, S.A.; ANDREW, S.E. Presence of opioid growth factor and its receptor in the normal dog, cat and horse cornea. **Veterinary Ophthalmology**, v.6, n.2, 131-134, 2003.

ROOK, J.M.; MCCARSON, K.E. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. **Biochememistry and Pharmacology**, v.74, n.5, p.752-757, 2007.

ROOK, J.M.; HASAN, W.; MCCARSON, K.E. Morphine-induced early delays in wound closure: involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. **Biochemical Pharmacology**, v.77, n.11, p.1747-1755, 2009.

ROSHANPOUR, M.; GHASEMI, M.; RIAZI, K.; RAFIEI-TABATABAEI, N.; GHAHREMANI, M.H.; DEHPOUR, A.R. Tolerance to the anticonvulsant effect of morphine in mice: blockage by ultra-low dose naltrexone. **Epilepsy Research**, v.83, n.2-3, p.261–4, 2009.

RÓZSA, A.J.; BEUERMAN, R.W. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. **Pain**, v.14, n.2, p.105-120, 1982.

SAKIMOTO, T.; SHOJI, J.; SAWA, M. Active form of gelatinases in tear fluid in patients with corneal ulcer or ocular burn. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.47, n.5, p.423-426, 2003.

SIVAK, J.M.; FINI, M.E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.21, n.1, p.1-14, 2002.

SMITH, V.A.; RISHMAWI, H.; HUSEIN, H. et al. Tear film MMP accumulation and corneal disease. **British Journal of Ophthalmology**, v.85, n.2, p.147-153, 2001.

SNOEK-van BEURDEN, P.A.; VON den HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, **Biotechniques**, v.38, n.1, p.23-83, 2005.

STEIN, C.; MILLAN, M.J.; YASSOURIDS, A. et al. Antinociceptive effects of mu- and kappa- agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid

receptor-specific mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v.155, n.3, p.255-264, 1988.

STEIN, C.; MILLAN, M.J.; SHIPPENBERG, T.S. Peripheral opioid receptor mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.248, n.3, p.1269-1275, 1989.

STILES, J.; HONDA, C.N.; KROHNE, S.G. et al. Effects of topical administration of 1% morphine sulfate solution on signs of pain and corneal wound healing in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.7, p.813-818, 2003.

STERN, N.E.; GAO, J.; BEUERMAN, R.W. et al. Effects of fourth-generation fluorquinolones on the ocular surface, epithelium, and wound healing. **Cornea**, v.25, n.9, S12-S24, 2006.

TERAO, T.; HISANAGA, E.; SAI, Y.; TAMAI, I.; TSUJI, A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.48, n.10, p.1083-1089, 1996.

TROST, K.; SKALICKY, M.; NELL, B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n.3, p.143-146, 2007.

TSUJI, A.; TERASAKI, T.; TAKABATAKE, Y.; TENDA, Y.; TAMAI, I.; YAMASHIMA, T.; MORITANI, S.; TSURUO, T.; YAMASHITA, J. P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. **Life Science**, v.51, n.18, p.1427-1437, 1992.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; JENKINS, J.B. et al. Naltrexone opioid antagonist, facilitates reepithelization of the cornea in diabetic rat. **Diabetes**, v.51, n.10, p.3055-3062, 2002.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; McLAUGHLIN, P.J. Reepithelization of the human cornea is regulated by endogenous opioids. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.41, n.1, p.73-81, 2000.

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; McLAUGHLIN, P.J. Reepithelization of the rabbit cornea is regulated by opioid growth factor. **Brain Research**, v.803, n.1-2, p.61-68,

ZEPPETELLA, G.; PAUL, J.; RIBEIRO, M.D. Analgesic efficacy of morphine applied topically to painful ulcers. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.25, n.6, p.555-558, 2003.

ZHOU, L.; ZHANG, Q.; STEIN, C.; SCHAFER, M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.286, n., p.1000-1006, 1998.

WEIGT, A.K. et al. Effects of cyclophotocoagulation with a neodymium: yttrium-aluminium-garnet laser, on corneal sensitivity, intraocular pressure, aqueous tear production, and corneal nerve morphology in eyes of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.6, p.906-914, 2002.

WENK, H.N.; BREDERSON, J.D.; HONDA, C.N. Morphine directly inhibits nociceptors in inflamed skin. **Journal of Neurophysiology**. v.95, n.4, p.2083-2097, 2006.

WENK, H.N.; HONDA, C.N. Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. **Journal of Comparative Neurology**, v.408, n.4, p.567-579, 1999.

WENK, H.N.; NANNENGA, M.N.; HONDA, C.N. Effect of morphine sulphate eye drops on hyperalgesia in the rat cornea. **Pain**, v.105, n.5, p. 455–465, 2003.

WILLIAMS, K.K.; McCARTNEY, M.D.; RICE, R.L.; MARTIN, B.; WAX, M.B.; HIDDEMEN, J.W. The effects of moxifloxacin ophthalmic solution 0.5% or gatifloxacin ophthalmic solution 0.3% treatment on corneal wound healing in pigmented rabbits following anterior keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.5, p.327–334, 2008.

WHITLEY, R.D.; GILGER, B.C. Diseases of the canine cornea and sclera. In: GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins, 3ed, 1999, p.635-673.

WOTMAN, K.L.; UTTER, M.E. Effect of treatment with a topical ophthalmic preparation of 1% nalbuphine solution on corneal sensitivity in clinically normal horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.71, n.2, p.223-228, 2010.

YE, Q.; van AMERONGEN, M.J., SANDHAM JA, BANK RA, van LUYN MJ, HARMSSEN MC. Site-specific tissue inhibitor of metalloproteinase-1 governs the matrix metalloproteinases-dependent degradation of crosslinked collagen scaffolds and is correlated with interleukin-10. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, prelo, 2010.