

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DO CETOROLACO DE TROMETAMINA 0,5%, SEM
CONSERVANTE, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA, A
SENSIBILIDADE E RE-EPITELIZAÇÃO CORNEAL EM
COELHOS SUBMETIDOS A ULCERAÇÃO QUÍMICA DA
CÓRNEA.**

Luciano Fernandes da Conceição
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DO CETOROLACO DE TROMETAMINA 0,5%, SEM
CONSERVANTE, SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA, A
SENSIBILIDADE E RE-EPITELIZAÇÃO CORNEAL EM
COELHOS SUBMETIDOS A ULCERAÇÃO QUÍMICA DA
CÓRNEA.**

Luciano Fernandes da Conceição
Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANO FERNANDES DA CONCEIÇÃO - nascido em 24 de agosto de 1978, em Casa Branca, São Paulo, graduou-se em Medicina Veterinária pela UNIFEOB – Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos em São João da Boa Vista - SP, em dezembro de 2003.

Concluiu a Residência Veterinária, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais e a Especialização, *Lato Sensu*, na área de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, na UNIFEOB - Centro Universitário Octávio Bastos, São João da Boa Vista - SP em janeiro de 2006.

Atualmente é aluno regular do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, nível de mestrado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus.

Dedicatória:

Aos meus pais Geraldo e Maria José (Zezé) e a minha irmã Lucy Mara,

Que em nenhum momento duvidaram da minha capacidade, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, me guiando e me compreendendo!

Muito obrigado por me ajudarem a realizar esse sonho!!!! À vocês minha eterna gratidão!!!

Amo vocês!!!!

*“Tudo que vivemos na vida é por amor,
O amor nos faz aprender no dia a dia,
Aprendemos a amar para ter uma vida melhor
para repassar...
Você ensina o que aprende,
e aprende o que ensina:
O amor é quem nos ensina”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

*... Ao querido Prof. Dr. José Luiz Laus,
que sempre me apoiou, mostrando a cada conversa o quanto é especial para
todos que orienta, obrigado por fazer parte do meu crescimento profissional!!!*

*... Ao amigo e co-orientador Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade
pelo apoio e dedicação imensuráveis*

*... Ao meu pai Geraldo da Conceição e minha mãe Maria José Fernandes
Conceição
que me fortalecem em todos os momentos da minha vida. AMO MUITO VOCÊS...*

*... A minha irmã Lucy Mara ,
Exemplo de força e superação.. amo você !!!!*

*... Aos meus sobrinhos Juninho, Daiane e Gabriel, por alegrarem a nossa família e
por sempre torcerem pelo tio Lu.*

*... Ao grande amigo Luciano Andreane,
Companheiro, incentivador dando-me exemplos bons, por me apoiar pra conseguir
chegar até aqui e por me ensinar como ser uma pessoa melhor todos os dias.*

*“As pessoas entram na nossa vida por acaso,
Mas não é por acaso que elas permanecem.”*

*... A amiga Juliana Cestari,,
adoro você!!*

... Aos amigos da Rep. Antro do HV – minha primeira casa nessa cidade.

*... Ao grande Amigo de residência Luciano Pereira
Amigo, parceiro e irmão.*

... Ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAVJ/UNESP.

*... A todos os pós-graduandos e residentes que ajudaram direta e indiretamente
nesse projeto em especial Bianca, Letícia, Patrícia, Miguel, Dunia, Ivan e
principalmente ao Alexandre (“Dedo”), por sempre estar disposto a me ajudar e
principalmente pela paciência ao me explicar a estatística... valeu...*

... Aos funcionários da pós-graduação, pela paciência de tirar todas as dúvidas finais.

... À todos os funcionários do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", pelo acolhimento e auxílio na realização da pesquisa;

... À todas as pessoas, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

... Aos professores componentes da banca de qualificação pelas correções e sugestões realizadas (Alexandre Lima de Andrade e Adriana Morales);

... Ao CNPq pela bolsa concedida.

... Aos veterinários e funcionários do Hovet- Dr. Vicente Borelli (Priscila, Gisele, Silvia, Angélica, Malu, Lúcia, Jefferson, Fernanda etc) pelo apoio.

... A Deus, fonte de tudo.

E a todos que a emoção não me permite lembrar neste momento, mas que fizeram parte deste trabalho de alguma forma ...Valeu

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“... Ao meu cão Ásthor... sei que em algum lugar vc está me esperando com a bolinha na boca, como sempre fez, cheio de amor, como sempre foi... qualquer dia amigo a gente vai se encontrar...”

“Alguns anjos não possuem asas, possuem quatro patas, um corpo peludo, nariz de bolinha, orelhas de atenção, olhar de aflição e carência.

Apesar dessa aparência, são tão anjos quanto os outros (aqueles com asas) e se dedicam aos seus humanos tanto quanto qualquer anjo costuma dedicar-se.”

Autor desconhecido.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Aspéctos Éticos	13
4.2 Animais.....	13
4.3 Grupos Experimentais e Momentos de Avaliação	13
4.4 Procedimento Cirúrgico	14
4.5 Critérios de Avaliação	17
4.5.1 Avaliação Clínica	17
4.5.1.1 Estesimetria	17
4.5.1.2Tempo de re-epitelização	21
4.5.2 Histologia	22
4.5.2.1 Histopatologia.....	22
4.5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	22
4.6 Estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Avaliação Clínica	25
5.2 Histologia	39
5.3 Microscopia eletrônica de varredura	49

6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICES.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem fotográfica ilustrando etapas de preparação e confecção das úlceras corneais em coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca. **A:** embebimento de disco de papel Filtro Watman 40 em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L. **B:** colocação de disco de 6.0 mm de papel filtro Watman 40 em região paracentral da córnea. **C:** lesão corneal (seta). Jaboticabal, 2009..... 16

Figura 2- Imagem fotográfica ilustrando a avaliação do limiar de sensibilidade corneal por estesiometria, após queimadura química com NaOH 1 mol/L, em coelho macho, adulto, Nova Zelândia Branca. Notar estesiômetro (seta branca) e filamento de *nylon* em contato a córnea (seta preta). Jaboticabal, 2009.....18

Figura 3 - Em A, úlceras corneais em coelho macho, adulto, Nova Zelândia Branca, coradas pela fluoresceína. Em B, biomicroscopia com luz em fenda e filtro azul cobalto. Jaboticabal, 2009.....19

Figura 4 – Imagem fotográfica ilustrando o método utilizado para quantificação da área ulcerada, em *software*, em olho direito de coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca. A área ulcerada em verde foi circundada (seta cheia) com auxílio da ferramenta *free hand selections* e quantificada (seta pontilhada). Jaboticabal, 2009.....21

Figura 5 – Imagem fotográfica do método utilizado para quantificação da densidade das microvilosidades em *software*, em olho direito de coelho macho adulto da raça Nova Zelândia Branca. Após binarizadas, as imagens mostram as microprojeções como pontos pretos (seta vermelha). Com auxílio da ferramenta *Analyze/ Analyze particles*, os pontos são quantificados numericamente (seta vasada). Jaboticabal, 2009.....23

Figura 6 - Média e erro padrão* da pressão intraocular (mmHg), antes (basal) e 10 minutos após a instilação de 30µL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córnea sadia de coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009. *Análise de variância para medidas repetidas ($p = 1,00$). Jaboticabal, 2009.....25

Figura 7 - Média e erro padrão* da sensibilidade corneal (g/mm^2), antes (basal) e após a instilação de 30µL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córnea sadia de coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. *Análise de variância para medidas repetidas ($p = 1,00$). Jaboticabal, 2009.....26

Figura 8 - Média e erro padrão* dos valores de blefarospasmo (resultado qualitativo), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia. Jaboticabal Branca. *Teste Tukey ($p < 0,001$). Jaboticabal, 2009.....28

Figura 9 - Média e erro* padrão dos valores de hiperemia conjuntival (resultado quali-quantitativo), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. Teste Tukey ($p < 0,001$)*, ($p < 0,01$)#. Jaboticabal, 2009.....29

Figura 10 : Curva de regressão linear entre o blefarospasmo e o limiar de sensibilidade corneal, em coelhos machos, adultos, raça Nova Zelândia Branca, após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Nos olhos controle (círculos abertos), os parâmetros se correlacionaram positivamente (A)*. Nos olhos tratados (círculos fechados), não se observou correlação entre os parâmetros (B) #. *($p = 0,02$; $r^2 = 0,17$), #($p = 0,23$; $r^2 = 0,05$). Jaboticabal, 2009.....30

Figura 11. Média ($\pm$ EPM)* dos valores relativos ao limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia, Branca, antes (Basal) e após abrasão química com NaOH 1 mol/L, nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5% e nos olhos que receberam solução salina 0,9%. * Teste Tukey ($p < 0,001$). Jaboticabal, 2009.....31

Figura 12 - Média e erro* padrão dos valores do limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. *Significativo ao Teste Tukey relativamente ao Basal ($p < 0,01$). Jaboticabal, 2009.....33

Figura 13 - Imagens fotográficas ilustrando a progressão da reepitelização corneal, desde o pós-operatório imediato, até as 44 horas após cauterização com NaOH a 1 mol/L, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca, tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC). Jaboticabal, 2009.....35

Figura 14 – Média e erro padrão* da área corneal ulcerada, de olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou com solução salina a 0,9% (OC), no pós-operatório imediato e demais períodos, até a re-epitelização corneal (55 horas), após cauterização com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos da raça Nova Zelândia Branca. *Teste Tukey ($<0,01$). [#](Image J). Jaboticabal, 2009.....36

Figura 15 - Média e erro padrão* do tempo de re-epitelização de úlceras corneais (horas), de olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou com solução salina a 0,9% (OC), após cauterização com NaOH 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. *Teste T Student pareado (0,010). Jaboticabal, 2009.....37

Figura 16 - Média e erro* padrão da velocidade média de re-epitelização de úlceras corneais ($\mu\text{m}/\text{hora}$), em olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. *Teste T Student pareado (0,016). Jaboticabal, 2009.....38

Figura 17 - Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, mostrando área de necrose do estroma corneal (asterisco) recoberta por epitélio estratificado composto por três camadas (seta). (HE, 10X). Jaboticabal, 2009.....39

Figura 18- Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com solução salina 0,9%, mostrando área necrose do estroma corneal (asterístico) e epitélio recobrindo a área de lesão constituído por epitélio estratificado composto por duas a três camadas (setas). (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.....41

Figura 19: Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante mostrando epitélio de camada única com degeneração balonosa (seta) recobrindo o estroma corneal. (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.....43

Figura 20 - Fotomicrografia de córnea de coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 55 horas de tratamento com solução salina 0,9%, mostrando área central da lesão recoberta por uma única camada de células epiteliais parcialmente aderida ao estroma (setas). (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.....45

Figura 21 - Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, mostrando inflamação aguda de polimorfonucleados (PMN) e congestão vascular (HE: 5X). Jaboticabal, 2009.....46

Figura 22: Fotomicrografia de córnea de coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 55 horas de tratamento com solução salina 0,9%, mostrando reação inflamatória moderada e congestão vascular abaixo do epitélio (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.....47

Figura 23 – Eletronmicrografia de varredura de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, 24 horas após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Em A, observa-se a migração do epitélio sobre o estroma acelular em olho controle (setas pretas). Em B, nota-se descamação de células periféricas migrando sobre o estroma, em olho tratado com cetorolaco de trometamina (setas brancas). Barra=10µm. Jaboticabal, 2009.....49

Figura 24 – Eletronmicrografia de varredura de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia, 55 horas após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Em A e B, observa-se aspecto poligonal das células epiteliais superficiais formando um mosaico. Em A, superfície corneal de olho controle mostrando aspecto mais aveludado (setas brancas), comparativamente à córnea de olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (B), que apresenta aspecto mais liso e descamado (setas pretas). Barra=10µm. Jaboticabal, 2009.....50

Figura 25 - Média e erro* padrão dos valores mensurados, relativamente à densidade das microvilosidades, 55 após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Teste T Student pareado ($p = 0,03$)*. Jaboticabal, 2009.....51

Figura 26 – Eletronmicrografia de varredura de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, 55 horas após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Em A, nota-se maior densidade de microvilosidades sobre a superfície das células epiteliais de olho controle (setas pretas), comparativamente, a olho tratado (B) com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (setas brancas). Em todos os olhos, observaram-se crateras centrais na maioria das células (setas vermelhas). Barra=5µm. Jaboticabal, 2009.....52

APÊNDICE

Apêndice 1 - Estatística descritiva da pressão intraocular (mmHg), antes (basal) e 10 minutos após a instilação de 30µL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córneas sadias de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....74

Apêndice 2 - Estatística descritiva do limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), antes (basal) e após a instilação de 30µL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córnea sadia de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....75

Apêndice 3 - Estatística descritiva dos valores qualiquantitativos atribuídos ao blefarospasmo, em córneas tratadas com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química da com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....76

Apêndice 4 - Estatística descritiva dos valores do resultado qualiquantitativo atribuído à hiperemia conjuntival, em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....77

Apêndice 5 - Estatística descritiva dos valores de limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....78

Apêndice 6 - Estatística descritiva quanto tempo de re-epitelização das úlceras, em córneas tratadas com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização com NaOH a 1 mol/L. em córnea de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....79

Apêndice 7 - Estatística descritiva da velocidade média de re-epitelização das úlceras ($\mu\text{m}/\text{hora}$), em córneas tratadas com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou com solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....80

Apêndice 8 - Estatística descritiva da densidade de microvilosidades ($\mu\text{m}/\text{hora}$), em ambos nos grupos tratados e controle, 48 horas após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.....81

**EFEITOS DO CETOROLACO DE TROMETAMINA 0,5%, SEM CONSERVANTE,
SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA, A SENSIBILIDADE E RE-EPITELIZAÇÃO
CORNEAL EM COELHOS SUBMETIDOS A ULCERAÇÃO QUÍMICA DA CÓRNEA.**

RESUMO: Estudou-se os efeitos do cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, sobre a inflamação ocular, avaliando-se a reparação epitelial e a sensibilidade corneal, em coelhos submetidos à ulceração corneal química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L. Constituíram-se dois grupos (n=12). O primeiro grupo recebeu 30 µl de cetorolaco de tometamina 0,5%, sem conservante (OT), a cada seis horas, em uma das córneas ulceradas e 30 µl de solução salina fisiológica 0.9% (OC) na córnea adelfa, totalizando 4 aplicações diárias, por um período de 24 horas. O limiar de sensibilidade corneal foi avaliado por estesiometria antes e posteriormente a lesão ser realizada, a intervalos regulares de quatro horas. Avaliou-se ainda o edema corneal, a hiperemia conjuntival, o blefarospasmo e o diâmetro das úlceras, empregando-se, biomicroscópio com lâmpada em fenda, teste do tingimento pela fluoresceína, imagem digitalizada para posterior avaliação em programa Image J, até a reepitelização completa. Decorridas 24 horas da abrasão nos animais do primeiro grupo (n=6) e 55 horas nos animais do segundo grupo (n=6), estes foram submetidos à eutanásia. Ambas as córneas (OT e OC) foram avaliadas histologicamente e à microscopia eletrônica de varredura. Utilizou-se Análise de Variância para Medidas Repetidas, considerando significativos os valores de $p \leq 0,05$. Conclui-se que mesmo sem a adição de conservantes e a despeito do bom efeito analgésico, o cetorolaco de trometamina a 0,5%, sem conservante, retarda a reparação cicatricial do epitélio corneal em coelhos submetidos a abrasões com hidróxido de sódio 1 mol/L.

Palavras chave: coelho, córnea, cetorolaco de trometamina, sensibilidade corneal, inflamação, re-epitelização corneal.

EFFECTS OF KETOROLAC TROMETHAMINE 0.5%, WITHOUT PRESERVATIVES, ON THE INFLAMMATORY RESPONSE, SENSITIVITY AND RE-EPITHELIALIZATION CORNEAL ULCERATION IN RABBITS SUBMITTED CHEMISTRY OF CORNEA.

ABSTRACT: Studied the effects of ketorolac tromethamine 0.5% without preservatives on ocular inflammation, evaluating the sensitivity and corneal epithelial repair in rabbits subjected to chemical corneal ulceration with sodium hydroxide (NaOH) 1 mol / L. Constituted two groups (n = 12). The first group received 30 µl of tometamine ketorolac 0.5%, without preservative (OT) every six hours in one of ulcerated corneas and 30 µl of saline solution 0.9% (OC) in the other cornea a total of four applications daily for a period of 24 hours. The threshold of corneal sensitivity was assessed by esthesiometry before and after the injury to be held at regular intervals of four hours. It was also evaluated corneal edema, conjunctival hyperemia, blepharospasm and the diameter of the ulcers, using, biomicroscopy with slit lamp, the fluorescein dye test, the scanned image for further evaluation in program Image J, until complete reepithelialization. After 24 hours of abrasion in the animals of first group (n = 6) and 55 hours in animals of the second group (n = 6), they were euthanized. Both corneas (OT and OC) were evaluated histologically and scanning electron microscopy. We used ANOVA for repeated measures, considering significant p values ≤ 0.05 . We conclude that even without the added preservatives and despite the good analgesic effect of ketorolac tromethamine 0.5%, without preservative, slowing the repair of corneal epithelium wound healing in rabbits subjected to abrasion with sodium hydroxide 1 mol/L.

Key words: rabbit, cornea, ketorolac tromethamine, corneal sensitivity, inflammation, corneal re-epithelialization.

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A córnea constitui-se em um tecido ricamente innervado. Participam axônios nociceptivos eferentes (MARFURT, MURPHY & FLORCKZAC, 2001; BENTLEY & MURPHY, 2004) provindos 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 a 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% delas respondam às forças mecânicas. Algumas fibras nociceptoras polimodais pertencem ao grupo de fibras pobremente mielinizadas. A maioria delas é do tipo C (BELMONTE, ACOSTA & GALLAR, 2004).

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. Impulsos elétricos gerados por nociceptores polimodais, não apenas sinalizam para a presença de um estímulo doloroso, como também codificam a sua intensidade e duração (BELMONTE, ACOSTA & GALLAR, 2004).

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, ACOSTA & GALLAR, 2004).

Ceratites ulcerativas acometem o homem e os animais e podem ser de gênese traumática, cirúrgica, infecciosa, auto-imune ou por ação direta de agentes químicos, além de outras causas (SZUCS, MASHED & ALLEGRA, 2000; ALBERTI, BOUAT & ALLAIRE, 2001; MURPHY, MARFURT & McDERMOTT, 2001; LEDBETTER et al., 2006). Tratam-se de condições que ensejam grande desconforto, conquanto a inervação nociceptora da córnea é, predominantemente, de superfície. A dor associada com as ulcerações corneais é, ainda, de difícil controle (STILES, HONDA & KROHNE, 2003).

Úlceras indolentes ou defeitos córneo-epiteliais espontâneos crônicos são afecções corneais comuns em cães, que, não raro, obrigam a múltiplos episódios de desbridamento e a ceratotomias (WHITLEY & GILGER, 1999; MURPHY, MARFURT & McDERMOTT, 2001; LEDBETTER et al., 2006). A dor perdura por semanas ou por meses (STILES, HONDA & KROHNE, 2003; LEDBETTER et al., 2006).

O controle da dor corneal pode ser direto ou indireto. Quando indireto, visa a acelerar a reparação corneal, diminuindo o tempo de exposição das terminações nervosas (STILES, HONDA & KROHNE, 2003).

Em seres humanos, as abrasões químicas compreendem 7 a 10% das afecções que acometem a superfície ocular. Dentre as mais danosas, destacam-se as queimaduras por álcali por penetrarem rapidamente as camadas da córnea, induzindo a intensa reação inflamatória, produção de enzimas proteolíticas, citocinas e perda da sensibilidade corneal. Mesmo após epitelizadas, córneas acometidas por abrasões químicas podem apresentar erosões recorrentes que culminam em perfuração ocular (HE, BAZAN & BAZAN, 2006).

Para preservar a integridade do epitélio corneal e prevenir a ulceração estromal, inúmeras estratégias terapêuticas têm sido investigadas. Dentre elas destacam-se o

uso tópico da fibronectina, do ácido retinóico, do hialuronato de sódio, de fatores de crescimento epidérmico e neuronal, inibidores de metaloproteínas, esteróides, ascorbato, citrato e do fator ativador de plaquetas. Outrossim, aplicam-se lente de contato, enxertos conjuntivais, transplante de células tronco e de córnea têm sido utilizados. Todavia, o protocolo ideal ainda não foi encontrado (STILES, HONDA & KROHNE, 2003).

Como opção para o tratamento da dor em abrasões corneais, preconiza-se a aplicação tópica de anti-inflamatórios não esteróides (AINES), que promovem algum grau de analgesia (SZUCS, MASHED & ALLEGRA, 2000; ALBERTI, BOUAT & ALLAIRE, 2001). Não obstante, AINES utilizados como analgésicos nas ceratites ulcerativas podem retardar a reparação e potencializar a degradação do estroma corneal (LINN, RAPUANO & LAISBONP, 2000; GUIDERA, LUCHS & UDEL, 2001). Não se indicam os anestésicos, por serem epiteliotóxicos (PEYMAN, RAHIMY & FERNANDES, 1994; MOREIRA, KASETSUWAN & SANCHEZ, 1999).

A reparação corneal é complexa, envolvendo a ação conjunta de fatores, como a proliferação e a migração centrípeta do epitélio, aliados a ação de mediadores químicos pre-existentes na matriz extracelular do estroma, à força mecânica exercida pelos movimentos palpebrais (BENTLEY & MURPHY, 2004), à viabilidade da membrana basal (MURPHY et al., 2001) e à integridade do filme pré-corneal (BROOKS & OLLIVER, 2004).

O olho possui mecanismos de barreira para a inflamação (barreira hemato-ocular, presença protetora das pálpebras, filme lacrimal, ossos da órbita, tolerância imune intra-ocular). A função visual é facilmente prejudicada por inflamação. Ocorre, também, que mediadores inflamatórios não são facilmente dissipados ou inativados no olho, como o

são em outros tecidos, por se tratar de um sistema fechado. Por essas razões, a inflamação ocular é, quase sempre, difusa tornando-se difícil precisar o local por onde se iniciou (SLATTER, 2005).

A inflamação ocular ocorre em resposta a danos celulares, por injúrias mecânica, química e térmica ou por influência endógena de origem celular ou humoral secundária a causas infecciosas ou imunemediadas (GIULIANO, 2004). Procedimentos cirúrgicos são também causais (WATERBURY & FLACH, 2006). A destruição tecidual pode ocorrer secundariamente ao processo inflamatório, pela ação de mediadores liberados por células inflamatórias ou pelo próprio tecido aviltado (GIULIANO, 2004). Após o dano à membrana celular, fosfolipídeos são liberados e hidrolisados pela fosfolipase A₂, resultando na formação do ácido araquidônico (AA). O metabolismo do AA ocorre pelas vias da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (VANDER WOERDT, 2001; GIULIANO, 2004; SLATTER, 2005; FITZGERALD, BRONSTEIN & FLOOD, 2006). Ciclooxigenases foram identificadas em diversas células, com exceção dos eritrócitos (RIBEIRO, 2007). A COX converte o AA em tromboxano A₂, prostaglandina E₂, PGE₂, PGF_{2α}, e produção de prostaciclina (PGI₂), enquanto que a atividade lipoxigenase converte o ácido araquidônico em leucotrienos (LTs) (VANDER WOERDT, 2001; GIULIANO, 2004; SELLERS et al, 2004; CLARK, 2006; FITZGERALD et al, 2006), hidroperóxido e ácido hidroxi-eicosatetraenóico (VAN DER WOERDT, 2001).

Ward et al. (1992) investigaram um inibidor de 5-lipoxigenase específico, o PF5901, na quebra da barreira sangue-humor aquoso de cães, utilizando a fluorofotometria da câmara anterior, em modelo de paracentese unilateral. Os resultados do estudo demonstraram que os LTs não são mediadores importantes na quebra da barreira

hemato-aquosa e que os inibidores de LTs podem exacerbar a quebra, pois interrompem o metabolismo de araquidonato em COX ou em epoxigenase.

Três isoformas da COX já foram identificadas (SELLERS, SILVERMAN & KHAN, 2004). A isoenzima COX-1 é uma enzima constitutiva expressa no retículo endoplasmático de todas as células, incluindo as plaquetas, as da mucosa gastrointestinal, do endotélio vascular, dos ductos coletores medulares renais, do intestino e dos sítios pulmonar, hepático e esplênico (GIULIANO, 2004; PAPICH, 2008). Sua expressão nos tecidos oculares varia segundo a espécie animal (RADI & RENDER, 2008). Prostaglandinas, prostaciclina e o tromboxano sintetizados por essa enzima são necessários para a manutenção da homeostase do trato gastrointestinal e do sistema renal, de plaquetas funcionais e do fluxo sanguíneo. Em contrapartida, a isoenzima COX-2, sintetizada por macrófagos e por células inflamatórias estimuladas por citocinas e por outros mediadores inflamatórios, está associada à inflamação e à dor, fazendo-se presente também em tecidos normais como no renal, com papel importante na sua fisiologia (PAPICH, 2000; GIULIANO, 2004; MARSHALL et al., 2004; SELLERS et al, 2004; FITZGERALD et al, 2006; SPINOSA et al, 2006, PAPICH, 2008). A COX-2 geralmente não é expressa nos tecidos oculares normais (RADI & RENDER, 2008).

Pesquisas em cães propuseram a existência da isoenzima COX-3, presente no cérebro (SPINOSA, GORNIK & BERNARDI, 2006). A COX-3 é uma variante da COX-1, e não um isômero distinto, sendo biologicamente diferente da COX-1. A COX-3 sintetiza menor quantidade das prostaglandinas e é inibida seletivamente pelo acetaminofeno e pela dipirona em cães (CLARK, 2006; PAPICH, 2008). Alguns AINEs que produzem analgesia, não são seletivos para COX-2, podem ter o seu mecanismo central de ação

para a COX-3. A COX-3 é uma enzima importante para cães, mais que para roedores de laboratório ou para o homem (PAPICH, 2008).

A COX-2 é expressa, por exemplo, em todas as camadas da córnea de cães com glaucoma, mas não o é na de cães saudáveis (RADI & RENDER, 2008). Marshall et al. (2004) encontraram expressão da COX-2 não somente em todas as camadas corneais, mas na esclera, na trama trabecular do ângulo de filtração, no plexo angular do aquoso e no corpo ciliar. O estudo refere que, por sua localização anatômica, é possível que a COX-2, na esclera e no plexo angular do aquoso, exerçam papel na patogênese do glaucoma, por modulação da produção e drenagem do aquoso. No entanto, não se sabe da função da COX-2 na córnea de um olho glaucomatoso.

Identificou-se a expressão de COX-2 em cães com ceratite, condição em que ela se mostrou aumentada na córnea, em menor intensidade no estroma da íris, e junto ao ângulo de filtração. Na córnea a expressão se deu no epitélio, no endotélio e nas células estromais, permitindo comprovar que a expressão de COX-2 aumenta em todas as camadas da córnea quando há inflamação (SELLERS, SILVERMAN & KHAN, 2004).

Os AINEs inibem a forma constitutiva da COX, a COX-1, assim como a indutiva, a COX-2, impedindo a gênese das prostaglandinas. O alvo de muitos dos AINEs é a COX-2. (GIULIANO, 2004; WILKIE & GEMENSKY-METZLER, 2004; KATZUNG, 2005; DUVALL & KERSHNER, 2006; RIBEIRO, 2007; PAPICH, 2008).

Embora os AINEs utilizados na oftalmologia veterinária variem quanto à seletividade para a COX-1 e a COX-2, muitos deles inibem ambas (GIULIANO, 2004; KATZUNG, 2005; SPINOSA, GORNIK & BERNARDI, 2006). A atividade inibitória de um fármaco para a COX-1 e para a COX-2 pode variar se os testes forem realizados com enzimas puras, homogenizados celulares, em células intactas ou de acordo com os

tipos celulares utilizados (PAPICH, 2000). A seletividade para COX-2 *versus* COX-1 é expressa como a taxa de COX-1/COX-2 inibitórios. Essa taxa é resultado de um estudo *in vivo* no qual o efeito inibitório, usualmente expresso como a concentração inibitória para inibir 50% da atividade, é mensurado pela estimulação de células que são capazes de expressar os produtos dessas enzimas. No ensaio, a fonte de produtos da COX-1 (tromboxano ou TXA₂) foram as plaquetas, e a dos produtos da COX-2 (PGE₂) foram os leucócitos. Quanto maiores os valores acima de 1.0, mais específicos são os fármacos para a COX-2, comparativamente à COX-1. O valor da magnitude da taxa para considerar o medicamento como "poupador de COX-1", "COX-2 específico", "COX-2 preferencial" ou "COX-2 específico" é subjetivo. O ensaio com o sangue total é o mais aceito e deve ser utilizado como padrão para se determinar a especificidade COX-1/COX-2. A vantagem do ensaio é que ele incorpora os componentes da circulação sanguínea: proteínas, células, plaquetas, e enzimas circulantes, que não estão presentes em células isoladas ou em sistemas enzimáticos utilizados em ensaios menos recentes. O ensaio com o sangue total mede os produtos da COX-2 (PGE₂) de leucócitos estimulados, e produtos da COX-1 (TXA₂) de plaquetas estimuladas (PAPICH, 2008).

Há provas de que os AINEs podem exercer outras ações anti-inflamatórias, além da inibição de COX. A supressão de leucócito polimorfonuclear, locomoção celular e quimiotaxia podem ocorrer como um efeito direto sobre os polimorfonucleares. Os AINEs podem exercer efeito anti-inflamatório na desativação de radicais livres e diminuição de superóxidos (GIULIANO, 2004; KATZUNG, 2005), promovem a infrarregulação da produção de interleucina-1 e a interferência nos eventos intracelulares mediados pelo cálcio (KATZUNG, 2005). Em modelos experimentais de alergia ocular, os AINEs

diminuíram a expressão de citocinas inflamatórias, assim como a degranulação de mastócitos. Como ácidos orgânicos, os AINEs acumulam-se nos sítios da inflamação, reduzindo as células inflamatórias no local (GIULIANO, 2004). Os AINEs diminuem a sensibilidade dos vasos sanguíneos à bradicinina e à histamina, afetam a produção de linfocinas pelos linfócitos T e reverterem a vasodilatação (KATZUNG, 2005).

Todos os AINEs são, em graus variáveis, analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos, à exceção dos fármacos COX-2 seletivos e dos salicilatos não acetilados, inibem a agregação plaquetária (KATZUNG, 2005; CLARK, 2006).

Os AINEs têm sido investigados por vários anos, e o seu uso local na oftalmologia veterinária vem se implementando. Os AINEs de uso local são mais indicados para o tratamento da inflamação ocular e são os de escolha quando há uma doença ocular infecciosa concomitante, assim como cerato-uveíte ulcerativa ou abscesso estromal (GIULIANO, 2004). Alguns agentes locais disponíveis, incluem a indometacina, o diclofenaco, flurbiprofeno, suprofen e o ceterolaco de trometamina (GIULIANO, 2004; WILKIE & GEMENSKY-METZLER, 2004). Os AINEs locais reduzem à inflamação pós-operatória após facectomias, controlam os sintomas da conjuntivite alérgica e aliviam a dor após cirurgia refrativa (a *laser*). Esses agentes têm se mostrado benéficos no pré-cirúrgico da catarata, para prevenir a inflamação ocular induzida por prostaglandinas e a miose indesejada durante a cirurgia (GIULIANO, 2004). São, usualmente, administrados imediatamente antes da cirurgia intraocular (WILKIE & GEMENSKY-METZLER, 2004). Os AINEs tópicos são aplicados de duas a quatro vezes ao dia (BID ou QID), dependendo da severidade da inflamação ocular (GIULIANO, 2004). Os AINEs tópicos agem na supressão do influxo de proteínas para o aquoso, em média, uma hora após instilados (RIBEIRO, 2007).

Fatores que afetam a biodisponibilidade dos AINEs pela via tópica, incluem a sua capacidade de penetração na câmara anterior, o seu metabolismo no estroma corneal e a sua ligação com proteínas estromais. O tamanho das partículas contidas na formulação pode ser determinante para a biodisponibilidade da molécula ativa, na suspensão (RIBEIRO, 2007).

O composto de amônio quaternário, cloreto de benzalcônio (BAK), é um antisséptico comum em formulações oftálmicas. Sua concentração varia de 0,004% para 0,02%. O BAK tem baixo poder de penetração corneal, o que o leva a se acumular, no epitélio da córnea. Uma vez que o epitélio corneal é uma barreira de proteção da superfície ocular, qualquer toxicidade a ele é prejudicial à córnea. Um dos principais efeitos da BAK na superfície da córnea é a ruptura dessa barreira funcional. Outros efeitos nocivos incluem a acelerada descamação celular, o comprometimento da re-epitelização corneal em casos de úlceras e a interrupção da mitose celular. Mecanismos outros não são bem elucidados, embora o BAK tenha sido encontrado induzindo a uma variedade de alterações celulares, tais como danos na membrana celular, depleção do trifosfato de adenosina (ATP), geração de estresse oxidativo, ativação de AP-1 e NF- κ B e apoptose (YING et al., 2007)

O epitélio corneal passa por contínuo processo de autorrenovação, para se manter íntegro. A condição envolve contínua perda de células superficiais descamadas e substituição celular a partir de camadas mais profundas que ocorre pela atividade mitótica apenas nas células epiteliais basais e porque a diminuição das células superficiais é

balanceada pela proliferação celular e por migração centrípeta. Assim, a descamação celular acelerada e a inibição da mitose celular ou a inibição da migração celular podem levar à perda de células na camada superficial, afetando a integridade da barreira epitelial (THOFT & FRIEND, 1983).

O ceterolaco de trometamina é um AINE que, à semelhança dos demais anti-inflamatórios de sua categoria, inibe a via cicloxigenase, promovendo supressão da liberação das prostaglandinas com diminuição da inflamação e da dor (BERNARDINI & NASSARALLA, 2001).

Em oftalmologia, sabe-se que o uso local de anti-inflamatórios pode retardar a re-epitelização corneal em casos de desepitelização mecânica. Alguns autores, como Hersh et al. (1990), observaram que os anti-inflamatórios não esteróides, como o diclofenaco e o flurbiprofeno, retardam a reparação do epitélio da córnea.

Waterbury, Kunysz e Beuerman (1987), Cohen et al. (1995), publicaram que o ceterolaco de trometamina, acrescido do conservante cloreto de benzalcônio, pode retardar a regeneração do epitélio corneal, todavia, sem significância estatística. Bernardini e Nassaralla (2001) descreveram efeito hipostésico em córneas sadias do homem.

2 - JUSTIFICATIVA

Queimaduras corneais químicas suscitam grande desconforto e o uso de anti-inflamatórios, como parte do tratamento em úlceras corneais, tem sido controverso. Há grupos que defendem o seu uso, tendo em vista, principalmente, seu efeito analgésico. Há outros, contudo que, condenam por acreditarem haver retardo na re-epitelização corneal.

Uma vez que o cloreto de benzalcônio é um anti-séptico comum em formulações oftálmicas e sabendo-se dos efeitos nocivos ao epitélio corneal (GUO et al., 2007) concebeu-se utilizar a formulação de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem o conservante. Buscou-se avaliar se o seu uso, em úlceras corneais provocadas por queimaduras químicas com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, implicaria no retardo da re-epitelização corneal mantendo suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias.

3 - OBJETIVOS

Avaliaram-se, clinicamente, por métodos quali-quantitativos e à microscopia de luz, os efeitos do uso local de ceterolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, sobre a re-epitelização e sensibilidade de córneas submetidas à abrasão química pelo hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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).

4.2 Animais

Utilizaram-se 12 coelhos, machos, da raça Nova Zelândia Branca, com peso médio de 3,4 kg e 120 dias de idade os quais, após exame clínico para exclusão de alterações orgânicas concorrentes, foram mantidos em gaiolas apropriadas, em ambiente ventilado, limpo, seco e protegido. Como alimento, forneceu-se ração comercial¹ e água potável *ad libitum*.

4.3 Grupos Experimentais e Momentos de Avaliação

Constituíram-se dois grupos, cada qual com seis animais. Cada animal teve os olhos submetidos à ulceração corneal química com NaOH 1 mol/L sendo suas córneas colhidas ou 24 horas após a lesão ou imediatamente à re-epitelização. Os olhos tratados receberam, imediatamente à lesão química com NaOH 1 mol/L, 30 µl de cetorolaco de

¹ Ração Nutri Coelho® (Purina, Brasil)

trometamina 0,5%, sem conservante² (OT), enquanto olhos controle (OC), receberam, com iguais critérios, solução salina 0,9%, ambos a intervalos regulares de 6 horas.

Os OT foram subdivididos em OT 24 horas após a lesão ter sido confeccionada e OT imediatamente À re-epitelização das úlceras. Com iguais critérios os OC também o foram. As córneas lesionadas foram avaliadas à biomicroscopia com luz em fenda e filtro azul cobalto, após instilação de fluoresceína, nos mesmos horários descritos previamente, pelo mesmo observador, desde o dia da confecção da úlcera, à sua re-epitelização à aplicação da fluoresceína negativa.

Previamente, os animais foram submetidos ao exame oftálmico, no qual se realizou a biomicroscopia com lâmpada em fenda³, oftalmoscopia binocular indireta⁴, o teste de sensibilidade corneal com estesiômetro de Cochet-Bonnet⁵, a tonometria de aplanção⁶, e a prova da fluoresceína⁷ para exclusão de animais com anormalidades concomitantes com a execução da pesquisa.

4.4 Procedimento Cirúrgico

Após indução da anestesia, por injeção intramuscular de 15 mg/kg de cetamina S+⁸ associada a 0,5 mg/kg de midazolam⁹ (BORKOWISKI & KARAS, 1999), realizou-se tricotomia periocular. Posteriormente, instilou-se de uma gota de proximetacaína¹⁰, para

² Acular® - sem conservante, Allergan – Guarulhos, São Paulo

³ Hawk Eye Slit Lamp (Dioptrix, França)

⁴ Oftalmoscópio binocular indireto OHC®, Eye Tec – São Carlos – SP

⁵ Estesiometer CochetBonett® - Lunaau, França

⁶ Tono-pen XL (Medtronic, EUA)

⁷ Fluoresceína strips (Ophthalmos, Brasil)

⁸ Cetamin S+® - Cristália, São Carlos, São Paulo

⁹ Dormire® - Cristáloa, São Carlos, São Paulo

uma melhor analgesia e antissepsia da córnea, do saco conjuntival e da conjuntiva com solução fisiológica acrescida de polivinil-pirrolidona na proporção de 50:1. A anestesia foi mantida empregando-se máscara com sevoflurano¹¹, diluído em oxigênio a 100%, em circuito aberto.

As intervenções cirúrgicas foram efetuadas empregando-se microscópio cirúrgico¹², em aumento de 20 vezes. Após medidas rotineiras de antissepsia, proteção do campo operatório e blefarostase, embebeu-se um disco de papel filtro Watman 40, recortado com o uso de trépano¹³, em 6.0 mm, em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, durante 30 segundos (Figura 1A). Ato contínuo, o disco foi colocado na região paracentral de ambas as córneas, durante um minuto (Figura 1B) e, em seguida, o excesso de NaOH 1 mol/L foi removido (Figura 1C), após o qual realizou-se lavagem copiosa dos olhos com solução salina 0,9%, durante um minuto.

¹⁰ Anestalcon®, Alcon, São Paulo, Brasil.

¹¹ Sevurane® - Cristália, São Carlos, São Paulo

¹² MC-M902®, DF Vasconcelos, São Paulo, SP

¹³ Trépano milimetrado (6.0mm) – Steel Inox, Campinas, SP

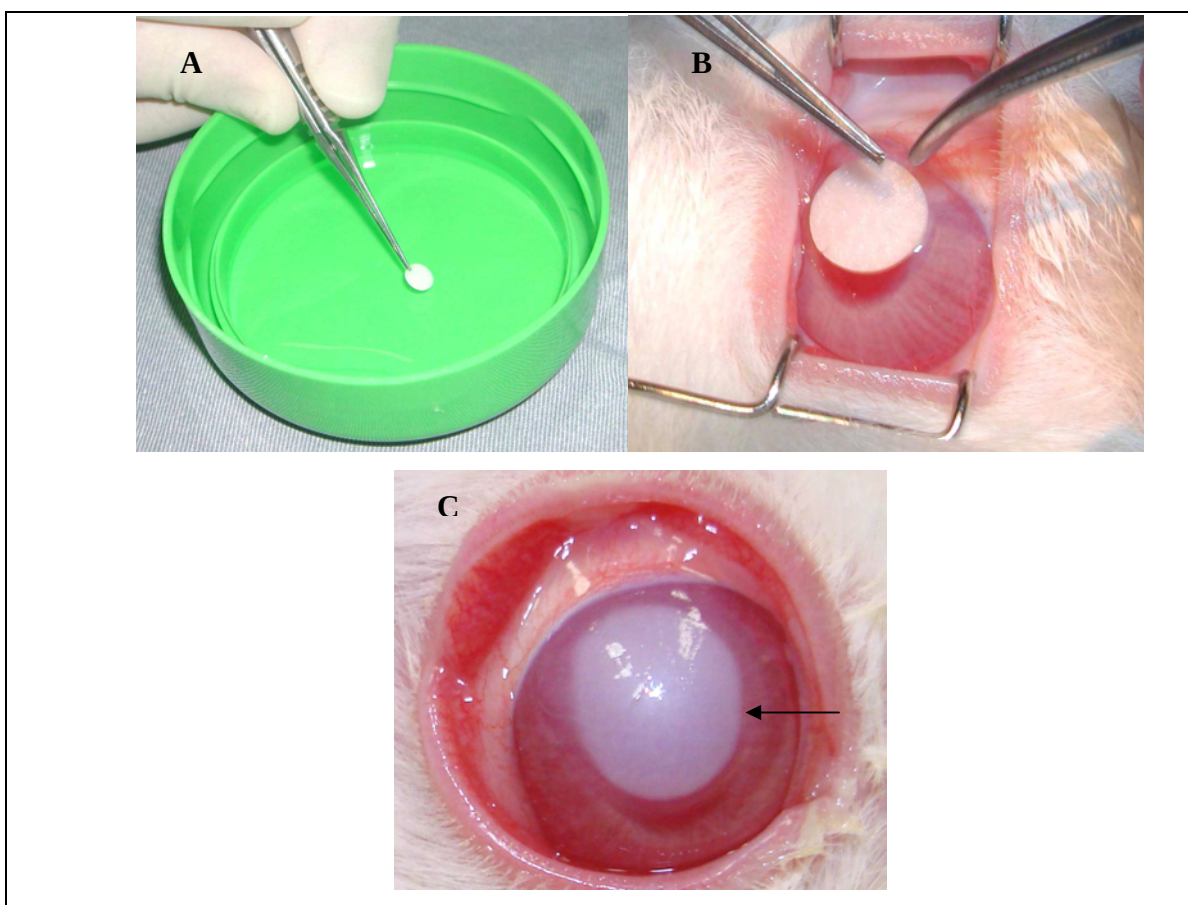


Figura 1- Imagem fotográfica ilustrando etapas de preparação e confecção das úlceras corneais em coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca. **A:** embebimento de disco de papel Filtro Watman 40 em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L. **B:** colocação de disco de 6.0 mm de papel filtro Watman 40 em região paracentral da córnea. **C:** lesão corneal (seta). Jaboticabal, 2009.

4.5 Critérios da Avaliação

4.5.1 Avaliação Clínica

Os animais foram avaliados clinicamente quanto ao edema corneal, dor, blefaroespasma e hiperemia conjuntival a cada 6 horas.

4.5.1.1 Estesiometria

A sensibilidade corneal foi avaliada à estesiometria, empregando-se o estesiômetro de Cochet-Bonnet (STILES et al., 2003) com o filamento de *nylon* regulado em tamanhos decrescentes de 6 cm até a ocorrência ao estímulo doloroso, momento em que o número do comprimento do fio era levado a uma tabela de conversão para se obter o valor, em g/mm^2 , da pressão exercida. O exame foi realizado colocando-se o aparelho perpendicularmente à córnea, exercendo-se uma leve pressão, com 3 toques, em média, na região para-central à lesão, tomando o cuidado para que o mesmo não tocasse a região palpebral (Figura 2).



Figura 2- Imagem fotográfica ilustrando a avaliação do limiar de sensibilidade corneal por estesiometria, após queimadura química com NaOH 1 mol/L, em coelho macho, adulto, Nova Zelândia Branca. Notar estesiômetro (seta branca) e filamento de *nylon* em contato a córnea (seta preta). Jaboticabal, 2009.

Os valores para o edema corneal, blefarospasmo e hiperemia conjuntival foram estimados em *scores* (0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado e 3 - severo). As córneas lesionadas foram avaliadas à biomicroscopia com luz em fenda e filtro azul cobalto, após instilação de fluoresceína e o tamanho das úlceras corneais o foi utilizando-se o sistema de análise de imagem da área corada (Figura 3A e 3B)

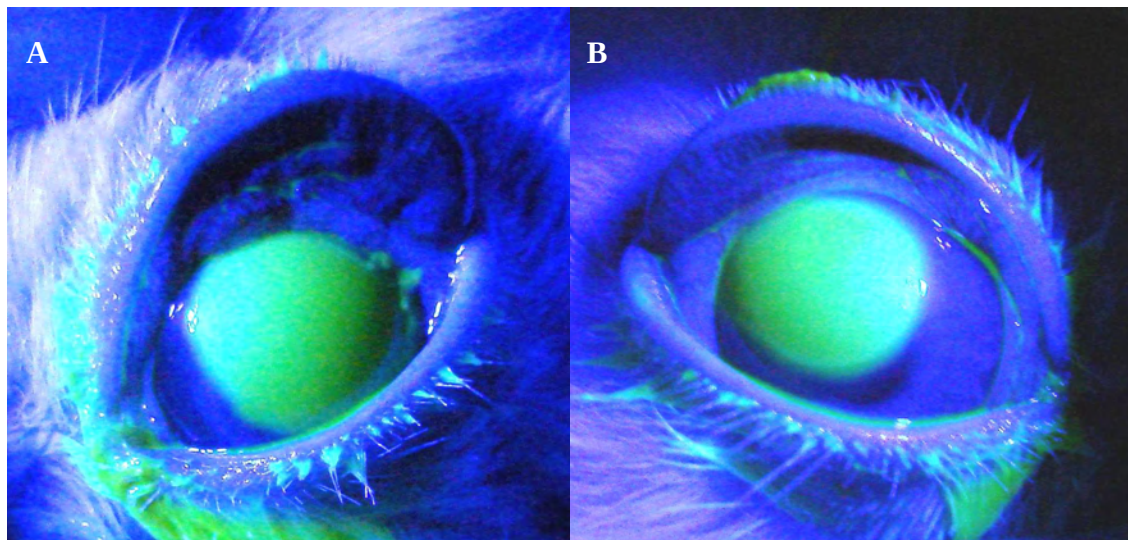


Figura 3 - Em A, úlceras corneais em coelho macho, adulto, Nova Zelândia Branca, coradas pela fluoresceína. Em B, biomicroscopia com luz em fenda e filtro azul cobalto. Jaboticabal, 2009.

Posteriormente à confecção das úlceras, as avaliações foram conduzidas 20 minutos após cada tratamento, por um mesmo examinador, em duplo cego.

4.5.1.2 Tempo de re-epitelização

Para quantificação da área ulcerada, os olhos foram fotografados em biomicroscópio com luz difusa, acoplado à câmera fotográfica¹⁴, a uma distância focal fixa estabelecida para cada animal. As imagens fotográficas foram avaliadas em *software*¹⁵ para quantificação da área ulcerada (WILLIAMS et al., 2007).

Após a seleção das imagens (ferramenta *File/Open*), a área ulcerada foi circundada com auxílio da ferramenta *free hand selections*, para obtenção do valor da área ulcerada (*Analyze/Measure*) (Figura 4).

¹⁴ Slit Lamp - Eagle Hawk Eye®, Dioptrix.

¹⁵ Image J, disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij>

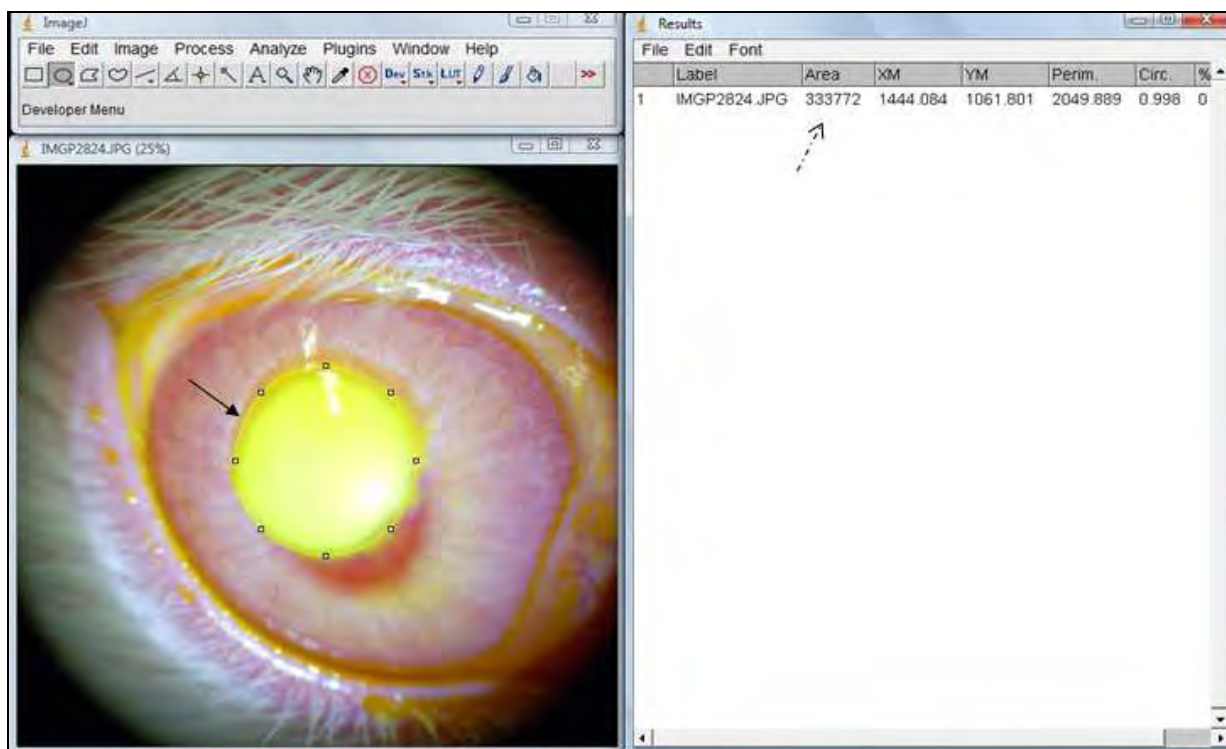


Figura 4 – Imagem fotográfica ilustrando o método utilizado para quantificação da área ulcerada, em *software*, em olho direito de coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca. A área ulcerada em verde foi circundada (seta cheia) com auxílio da ferramenta *free hand selections* e quantificada (seta pontilhada). Jaboticabal, 2009.

4.5.2 Histologia

4.5.2.1 Histopatologia

Decorridas 24 horas das lesões iniciais das córneas de ambos os olhos (OC e OT), seis animais foram submetidos à eutanásia ativa e tiveram seus olhos colhidos para avaliação do tecido corneal. Tal evento se repetiu para os outros 6 animais, que tiveram suas córneas colhidas após a re-epitelização corneal. As córneas foram colhidas e

separadas em dois hemisférios. Um hemisfério foi mantido em formol tamponado a 10%, durante 24 horas e, posteriormente, em solução de álcool 70%, durante 3 dias. Ato contínuo, o fragmento foi processado (banhos sucessivos em álcool 70°, 90° e 95° e xilol) e incluído em parafina, e cortado em micrótomo a uma espessura de 5 µm. De cada amostra, fizeram-se 6 cortes que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Anotaram-se, especialmente, os eventos referentes ao edema, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e de mononucleares, vascularização corneal e fibrose. O outro hemisfério foi fixado em glutaraldeído 2%, para avaliação em microscopia eletrônica de varredura.

4.5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Após serem fixadas em glutaraldeído 2%, por 48 horas, os tecidos corneais foram tratados com tetraóxido de ósmio e transferidas para álcool 70%. Posteriormente, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool até atingir 100%. Desidratadas, as amostras foram secas em câmara de CO₂, à temperatura de 37° C e pressão de 1500 PSI por, aproximadamente, 20 minutos. Os fragmentos foram metalizados com ouro e montados com auxílio de fita adesiva. As avaliações foram feitas com acelerações de 15 a 20 kV, em aumentos de 750 a 5000 vezes. As fotografias foram impressas em papel térmico¹⁶ e escaneadas em vídeo impressora¹⁷, para posterior avaliação. Cinco a seis imagens foram capturadas aleatoriamente de cada amostra, na região central da córnea, com aumento de 5000 vezes, para quantificação da densidade das microvilosidades.

¹⁶ Papel Térmico Mitsubishi K65 HM.

¹⁷ Vídeo Impressora Mitsubishi P90W.

A densidade de microvilosidades foi quantificada segundo método descrito por Julio et al. (2008). Após a seleção da imagem (ferramenta *File/Open*), a mesma foi binarizada (*Process/Make binary/watershed*). As partículas em preto (Figura 5), representando as projeções das microvilosidades, foram quantificadas após a seleção da ferramenta (*Analyze/Analyze particles*), sendo o tamanho das partículas fixado em 9 megapíxels-infinito. Os valores obtidos foram convertidos, por regra de três simples, em μm^2 .

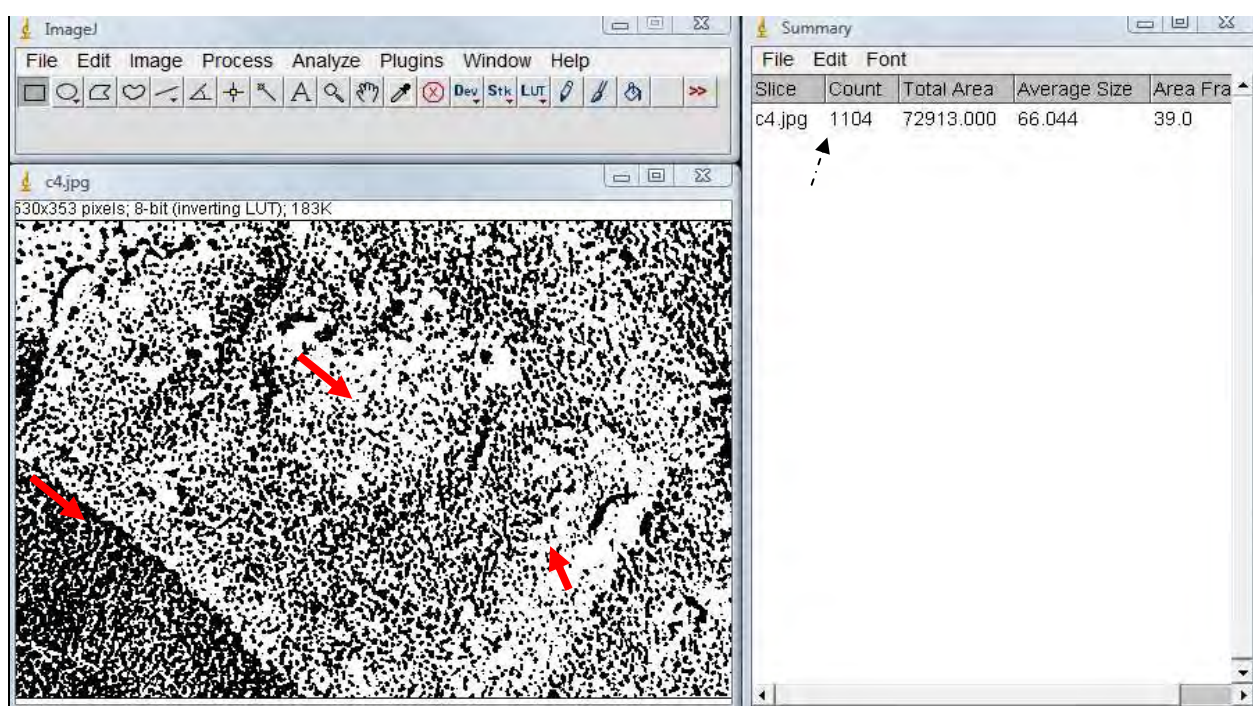


Figura 5 – Imagem fotográfica do método utilizado para quantificação da densidade das microvilosidades em *software*, em olho direito de coelho macho adulto da raça Nova Zelândia Branca. Após binarizadas, as imagens mostram as microprojeções como pontos pretos (seta vermelha). Com auxílio da ferramenta *Analyze/ Analyze particles*, os pontos são quantificados numericamente (seta vasada). Jaboticabal, 2009.

4.6 Estatística

Empregou-se Análise de Variância para Medidas Repetidas, com posterior avaliação pelo teste Tukey, considerando-se o nível mínimo de significância $p \leq 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 Avaliação Clínica

Os dados avaliados encontram-se expressos em média e erro padrão da média ($\pm$ EP). Os dados relativos aos valores basais de pressão intraocular (mmHg) e de sensibilidade corneal (g/mm^2) encontram-se sumarizados no apêndice.

Relativamente à pressão intraocular e ao limiar de sensibilidade corneal, não se encontrou diferença significativa antes e após o uso de solução salina (OC), tampouco em relação aos efeitos do cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ($p=1,00$) em olhos sadios (tempo 0) figuras 6 e 7 e apêndice 1 e 2.

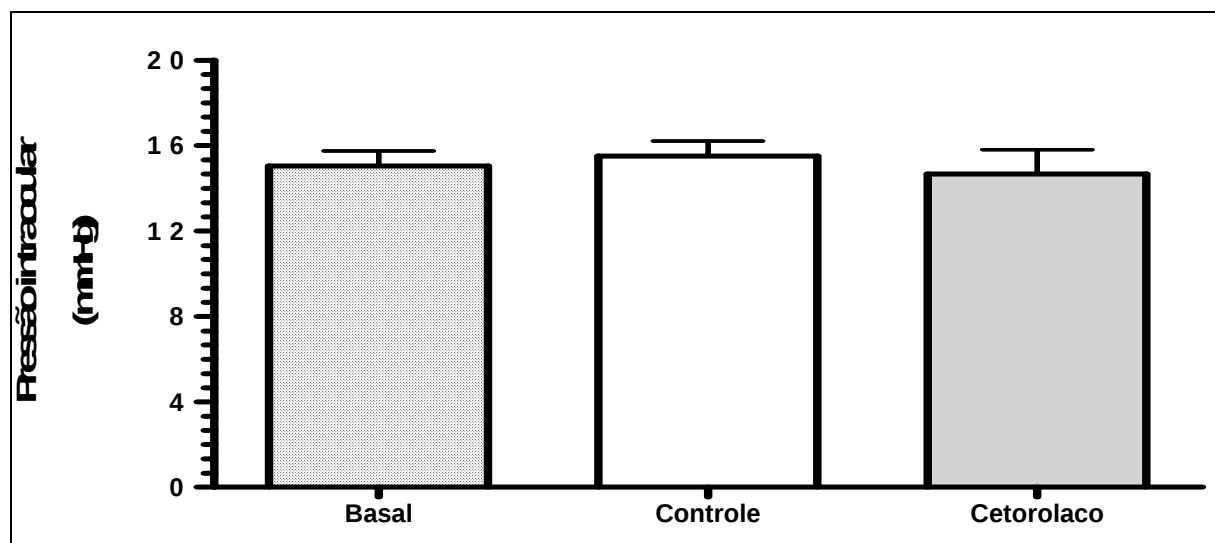


Figura 6 - Média e erro padrão* da pressão intraocular (mmHg), antes (basal) e 10 minutos após a instilação de 30µL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córnea sadia de coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009. *Análise de variância para medidas repetidas ($p = 1,00$). Jaboticabal, 2009.

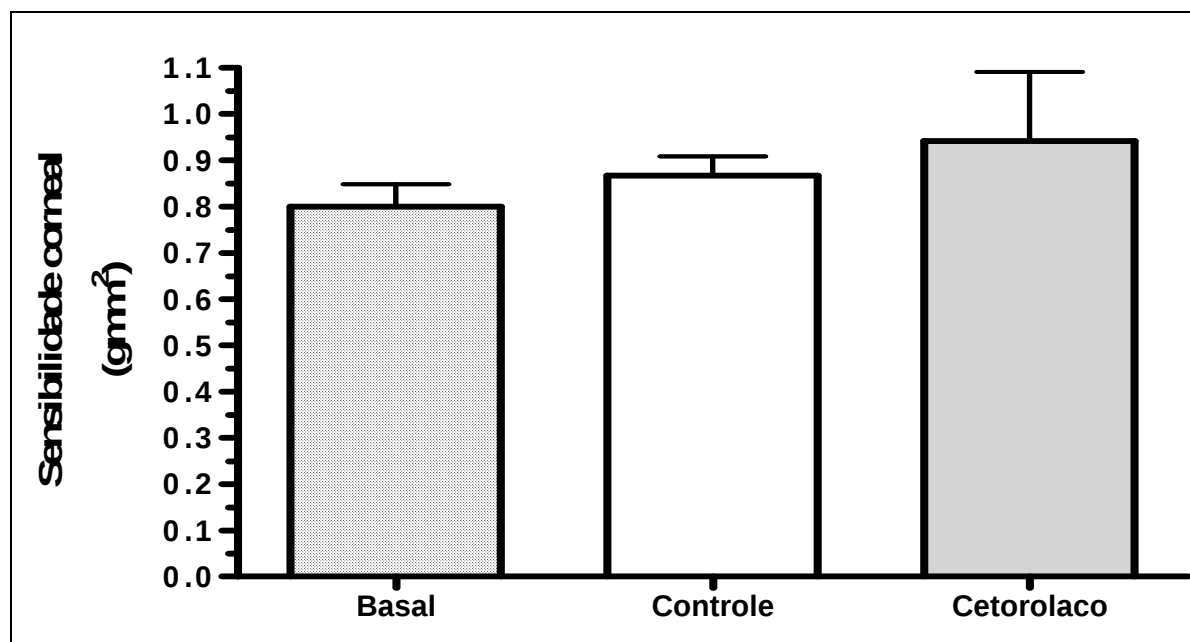


Figura 7 - Média e erro padrão* da sensibilidade corneal (g/mm^2), antes (basal) e 10 minutos após a instilação de 30 μL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córnea sadia de coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. *Análise de variância para medidas repetidas ($p = 1,00$). Jaboticabal, 2009.

Relativamente ao edema corneal, ele se manifestou de forma severa, na região paracentral da córnea, com proporções compatíveis com o diâmetro (6.0 mm) da lesão ensejada pelo contato prévio com o disco utilizado para confecção das úlceras (NaOH 1 mol/L), em ambos os olhos (OT e OC) e em todos os momentos ($p=1,00$). Outrossim, notou-se edema perilesional moderado, que regrediu, em ambos os olhos (OT e OC) .

Relativamente ao blefarospamo, decorridas 8 horas da cauterização química com NaOH a 1 mol/L, os olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, apresentaram resultados quali-quantitativos significativamente inferiores,

comparativamente aos olhos que receberam solução salina 0,9% ($p < 0,001$). Decorridas 20 horas das cirurgias o parâmetro, elevou-se em 86% nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, comparativamente ao atribuído 12 horas anteriormente, no mesmo grupo ($p < 0,05$). Às 20 horas de pós-operatório, o blefarospasmo nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, foi 30% maior que o observado nos olhos que receberam solução salina 0,9%. Nas avaliações seguintes (24 e 30 horas após as cirurgias), observou-se do blefarospasmo em ambos os olhos, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$), figura 8 e apêndice 3.

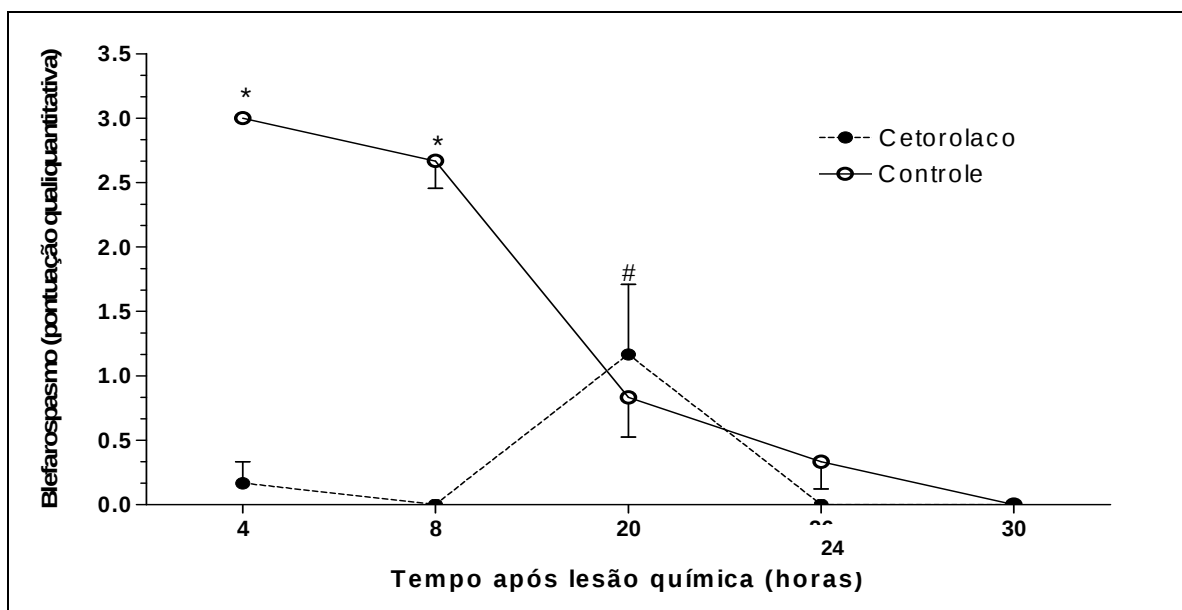


Figura 8 - Média e erro padrão* dos valores de blefarospasmo (resultado quali-quantitativo), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia. Jaboticabal Branca.

*Teste Tukey ($p < 0,001$). Jaboticabal, 2009.

Relativamente à hiperemia conjuntival, os olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT), apresentaram valores significativamente menores que os que receberam solução salina 0,9% (OC), até a 24^a hora de pós-operatório ($p < 0,01$). Decorridas 30 horas do trauma químico, os olhos controle apresentaram redução de 69% nos resultados atribuídos a este parâmetro. Ainda às 30 horas de pós-operatório, o resultado quali-quantitativo atribuído aos OC foi 80% maior que aos OT, figura 9 e apêndice 4.

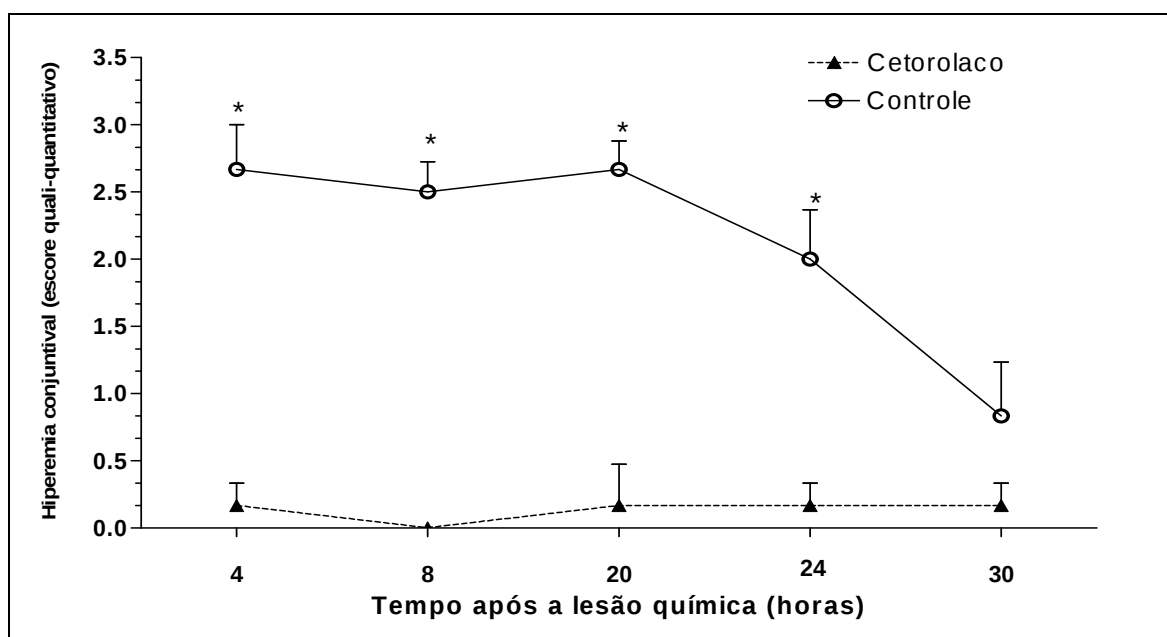


Figura 9 - Média e erro* padrão dos valores de hiperemia conjuntival (resultado quali-quantitativo), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. Teste Tukey ($p < 0,001$)*, ($p < 0,01$)[#]. Jaboticabal, 2009.

Posteriormente a realização das abrasões, os parâmetros blefarospasmo e limiar de sensibilidade corneal se correlacionaram positivamente nos olhos controle ($p = 0,02$; $r^2 = 0,17$). Não obstante, tais parâmetros não se correlacionaram nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante ($p = 0,23$; $r^2 = 0,05$) Figura 10.

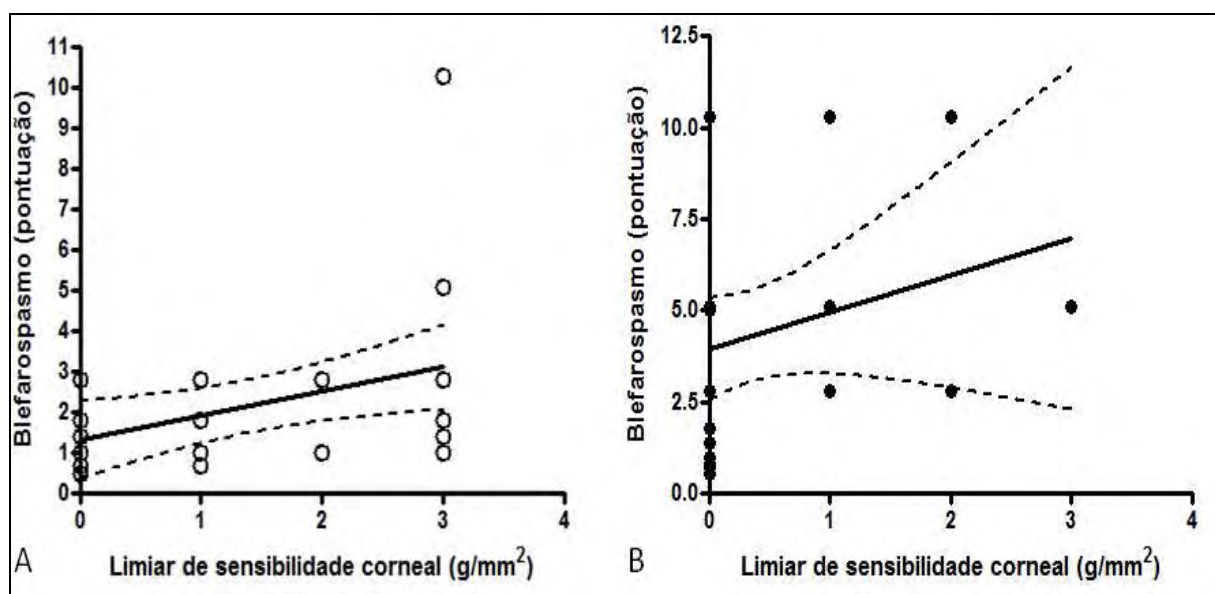


Figura 10 : Curva de regressão linear entre o blefarospasmo e o limiar de sensibilidade corneal, em coelhos machos, adultos, raça Nova Zelândia Branca, após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Nos olhos controle (círculos abertos), os parâmetros se correlacionaram positivamente (A)*. Nos olhos tratados (círculos fechados), não se observou correlação entre os parâmetros (B) [#]. *(p= 0,02; r²=0,17), [#](p=0,23; r²=0,05). Jaboticabal, 2009.

A somatória dos valores obtidos em todos os períodos avaliados, após as abrasões químicas, permitiu observar nos olhos tratados com cetorolaco, limiar de sensibilidade corneal mais elevado que nos controles e os valores basais, havendo diferença significativa (p<0,001). Ao se compararem os valores basais com os valores obtidos após a cauterização química dos olhos controle, embora estes se elevarem em 37%, não se observou significância estatística (p>0,05). Figura 11.

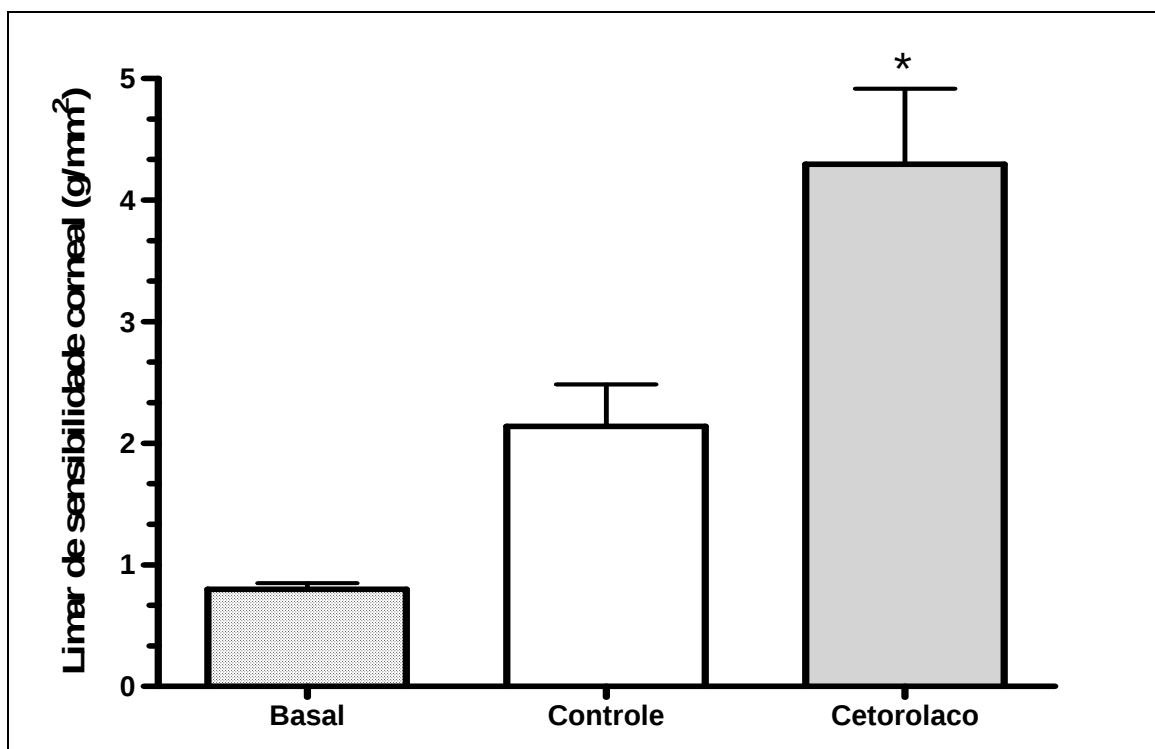


Figura 11. Média ($\pm$ EPM)* dos valores relativos ao limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia, Branca, antes (Basal) e após abrasão química com NaOH 1 mol/L, nos olhos tratados com ceterolaco de trometamina 0,5% e nos olhos que receberam solução salina 0,9%.

* Teste Tukey ($p < 0,001$). Jaboticabal, 2009.

Decorridas 4 horas das cirurgias, o limiar de sensibilidade corneal elevou-se em ambos os olhos (OT e OC), relativamente ao aferido previamente às cirurgias (basal). Entretanto, apenas nos olhos tratados com ceterolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, constatou-se diferença significativa em relação às avaliações basais ($p < 0,01$). Até a re-epitelização das úlceras, os olhos tratados com ceterolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, apresentaram valores no limiar de sensibilidade

corneal superiores aos olhos que receberam solução salina 0,9%, sem que houvesse, diferença significativa entre ambos ($p>0,05$). Decorridas 30 horas de pós-operatório, constatou-se redução de 66% no limiar de sensibilidade corneal nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, e de 65% nos olhos que receberam solução salina 0,9% ($P>0,05$), figura 12 e apêndice 5.

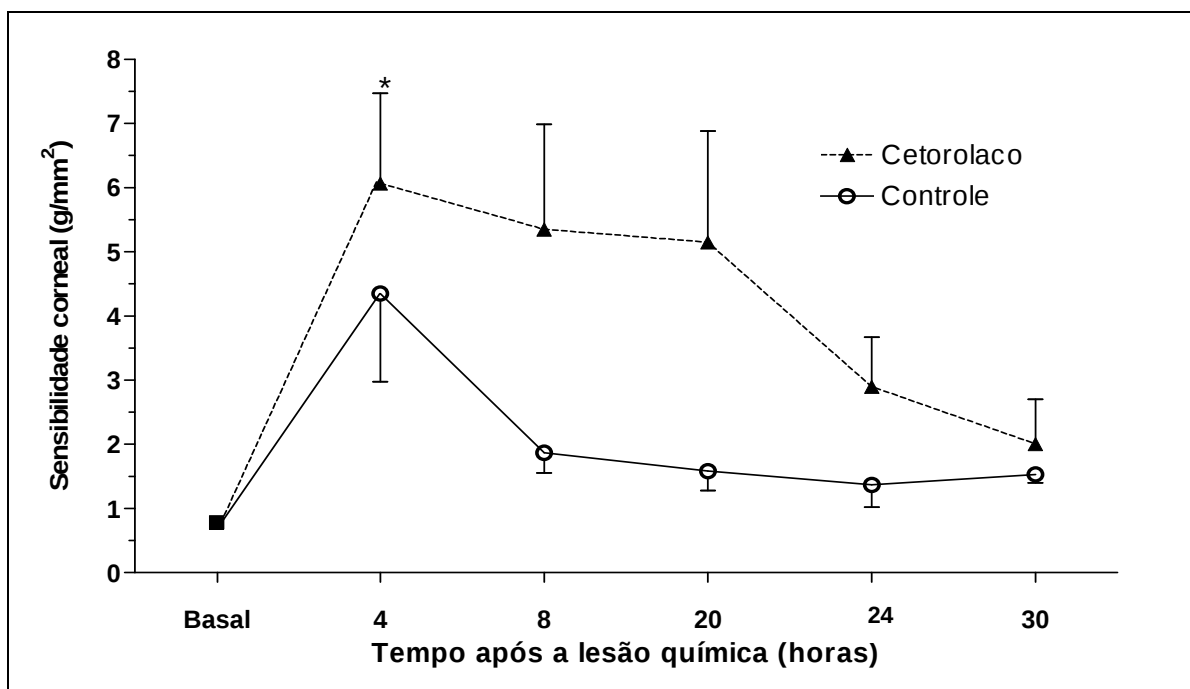


Figura 12 - Média e erro* padrão dos valores do limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca.

*Significativo ao Teste Tukey relativamente ao Basal ($p < 0,01$). Jaboticabal, 2009.

Relativamente ao diâmetro das áreas ulceradas, os olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT), apresentaram valores superiores aos olhos controle (OC) em todos os períodos avaliados. Houve significância estatística às 14 e 20 horas após a lesão química ($p < 0,01$) (Figuras 13 e 14). O tempo médio para que o teste do tingimento pela fluoresceína fosse negativo (horas), assim como o velocidade média de re-epitelização ($\mu\text{m/hora}$), diferiram significativamente entre os olhos tratados

com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) e os olhos controle (OC) ($p<0,05$). Figuras 15 e 16 e apêndice 6 e 7.

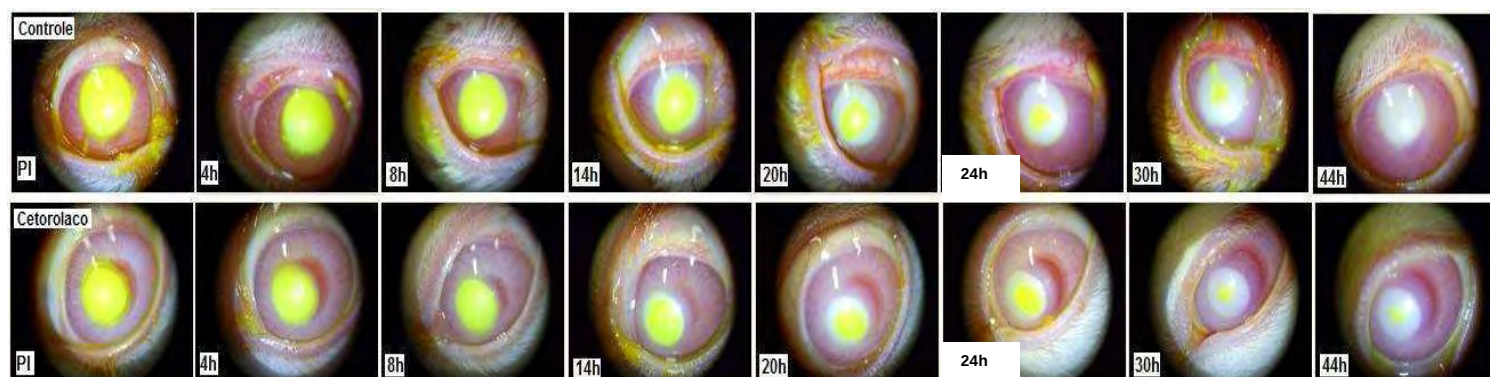


Figura 13 - Imagens fotográficas ilustrando a progressão da reepitelização corneal, desde o pós-operatório imediato, até as 44 horas após cauterização com NaOH a 1 mol/L, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca, tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC). Jaboticabal, 2009.

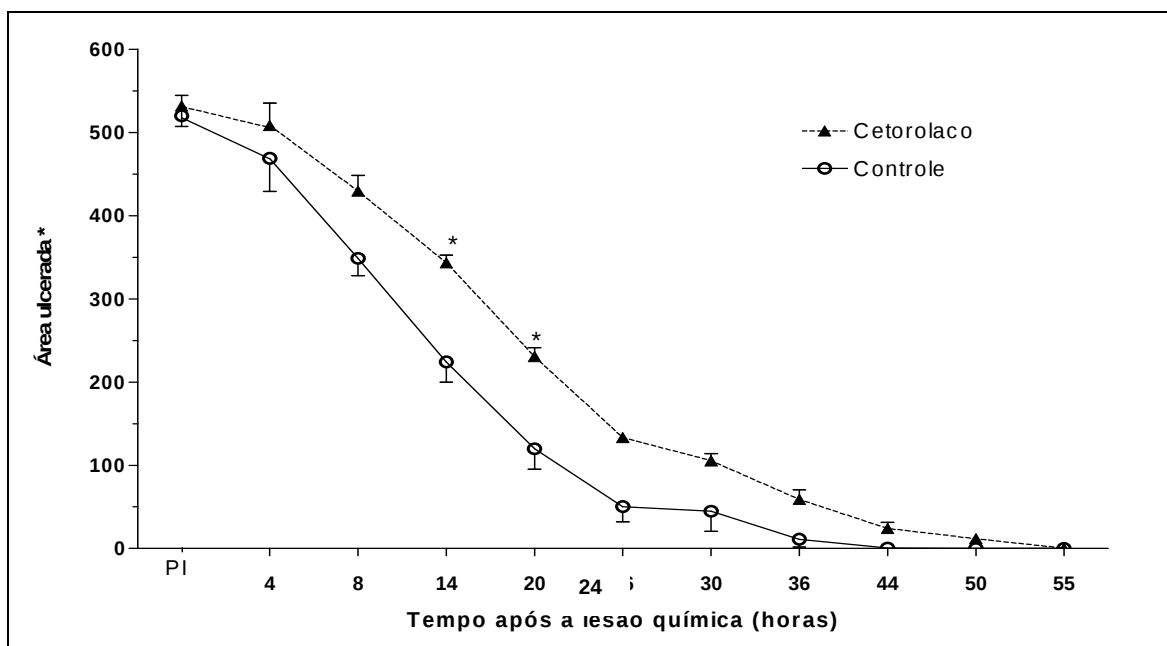


Figura 14 – Média e erro padrão* da área corneal ulcerada, de olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou com solução salina a 0,9% (OC), no pós-operatório imediato e demais períodos, até a re-epitelização corneal (55 horas), após cauterização com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos da raça Nova Zelândia Branca. *Teste Tukey (<0,01). # (Image J). Jaboticabal, 2009.

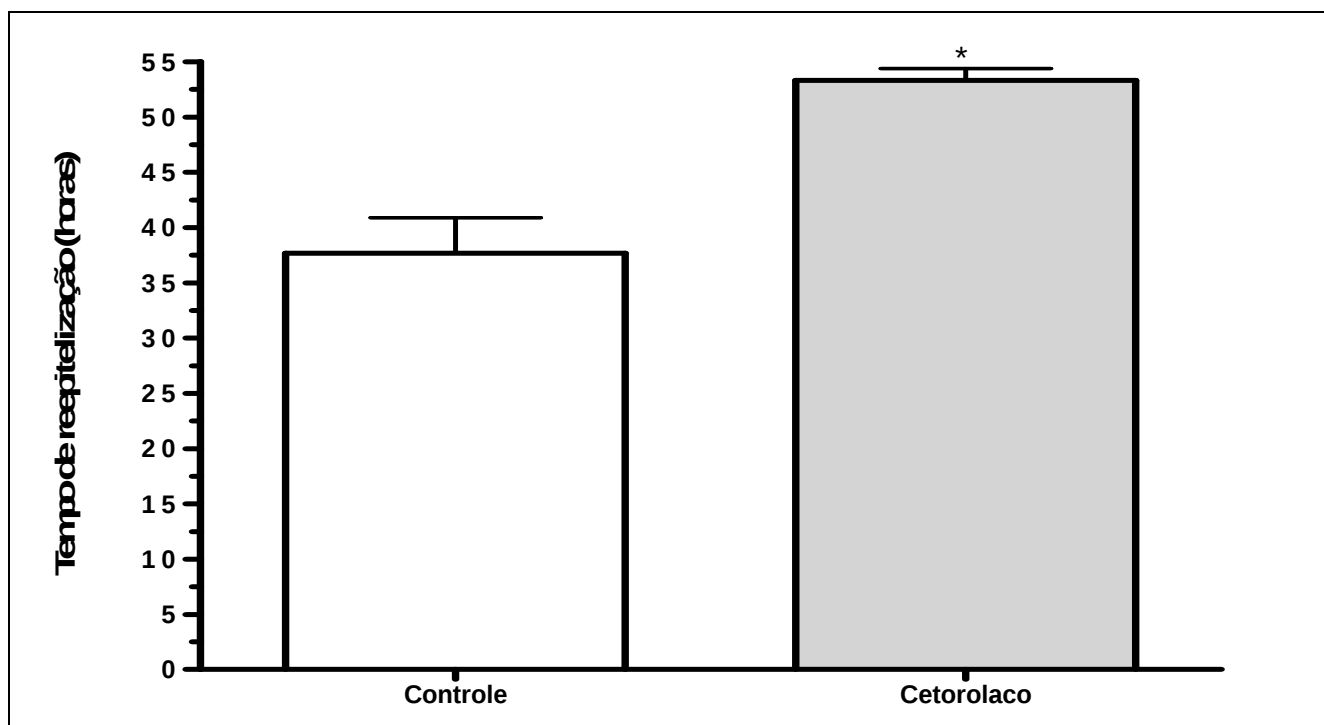


Figura 15 - Média e erro padrão* do tempo de re-epitelização de úlceras corneais (horas), de olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou com solução salina a 0,9% (OC), após cauterização com NaOH 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. *Teste T Student pareado (0,010). Jaboticabal, 2009.

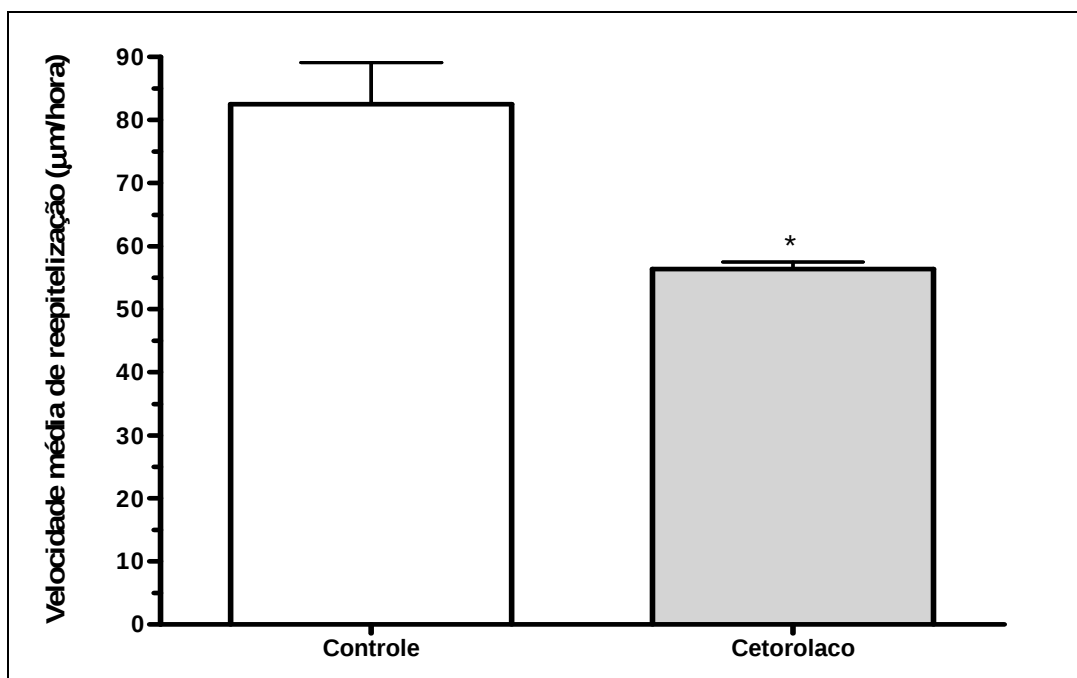


Figura 16 - Média e erro* padrão da velocidade média de re-epitelização de úlceras corneais (µm/hora), em olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, Nova Zelândia Branca. *Teste T Student pareado (0,016). Jaboticabal, 2009.

5.2 Histologia

Os achados, à histologia, das córneas que receberam tratamento com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, ou solução salina a 0,9% apresentaram, nos dois momentos de avaliação (24 e 55 horas), resultados similares quanto às lesões no estroma adjacente à lesão química. Outras alterações foram observadas quanto ao

processo inflamatório subjacente ao epitélio límbico e ao corneal neoformado sobre a lesão.

Relativamente ao estroma adjacente, o mesmo se apresentava necrótico e sem celularidade. Tal evento se deu nos olhos tratados (Figura 17) e nos olho controles em ambos os momentos de avaliação.

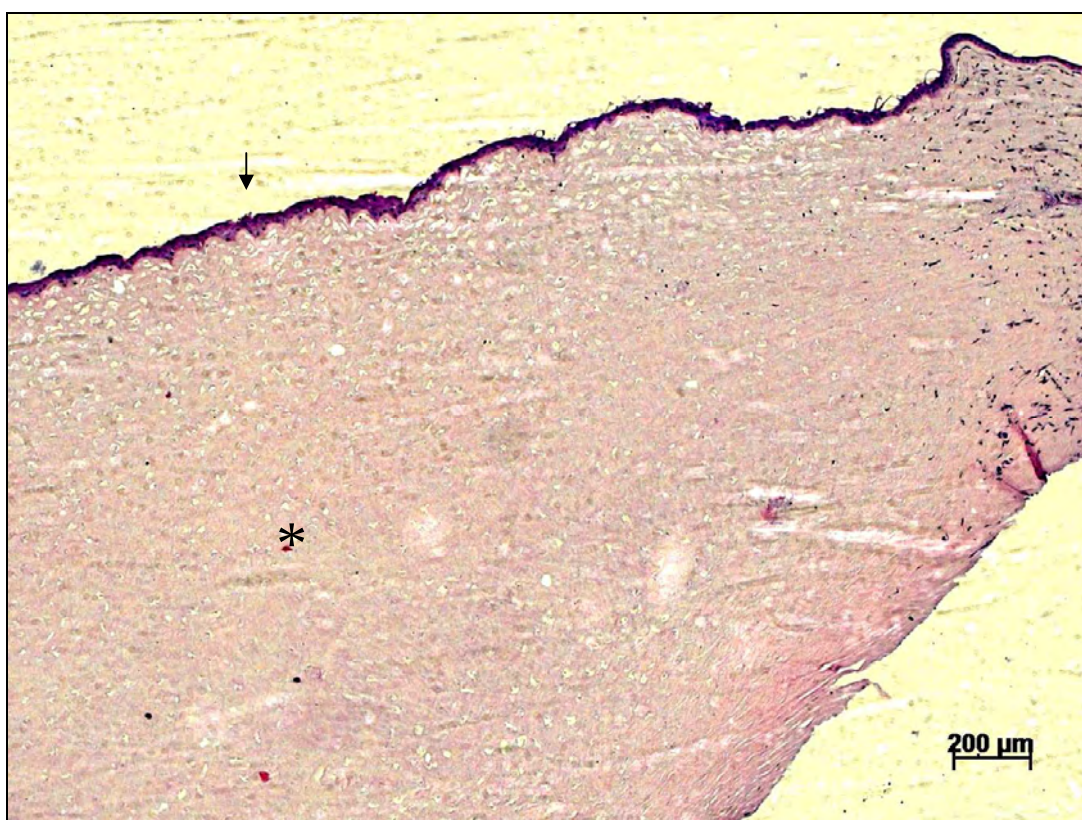


Figura 17 - Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, mostrando área de necrose do estroma corneal (asterisco) recoberta por epitélio estratificado composto por três camadas (seta). (HE, 10X). Jaboticabal, 2009.

O epitélio corneal neoformado apresentava características diferentes entre os olhos tratados e os não tratados. Os olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, após 24 horas apresentavam epitélio neoformado com duas a três camadas de células epiteliais (Figura 18), porém não ocupando a totalidade da superfície corneal desepitelizada, diferentemente das córneas controle, que apresentavam um epitélio novo, porém com estratificação única (Figura 19).

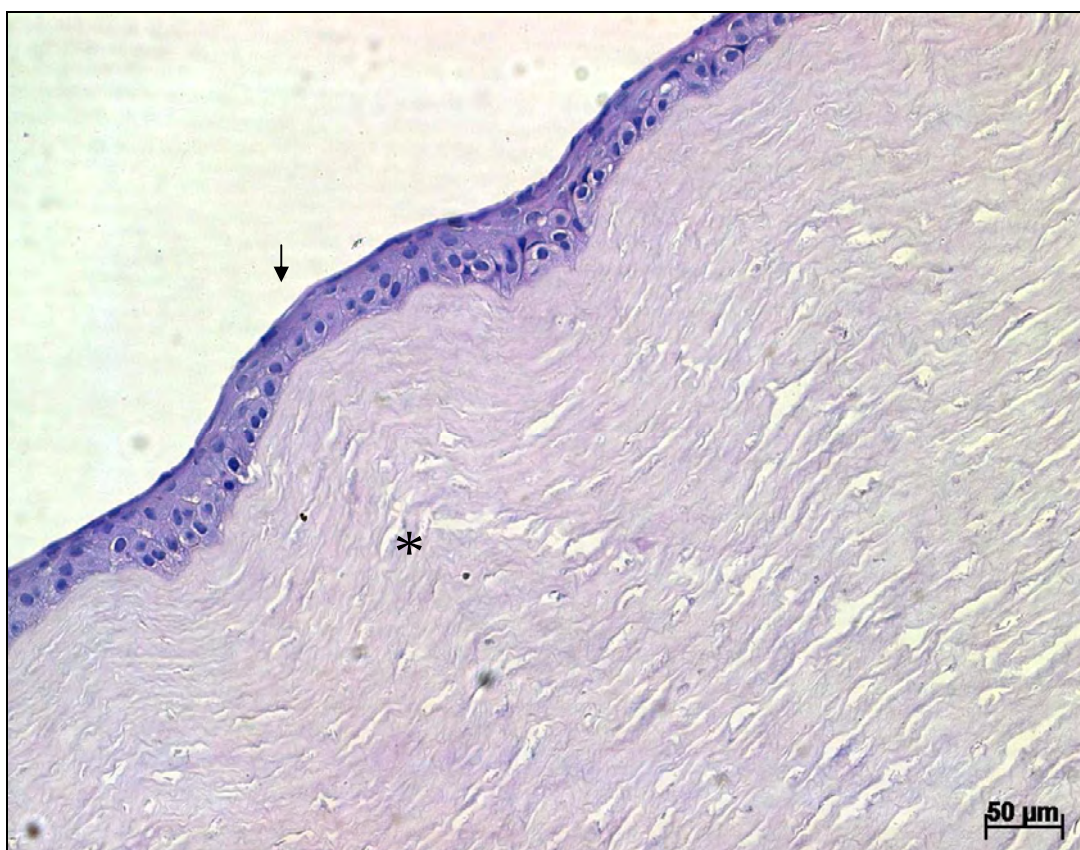


Figura 18- Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com solução salina 0,9%, mostrando área necrose do estroma corneal (asterístico) e epitélio recobrindo a área de lesão constituído por epitélio estratificado composto por duas a três camadas (setas). (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.

Decorridas 55 horas do trauma químico, as córneas tratadas e as não tratadas mostravam-se praticamente epitelizadas mas com o epitélio solto na área central da lesão, sobre o estroma necrótico, nas córneas não tratadas (Figura 20). Observou-se, adjunto, que o epitélio estratificado com degeneração balonosa, junto à margem da lesão, desaparecendo no sentido do epitélio límbico (distante da lesão). As córneas controles, nesse mesmo período, apresentavam o epitélio ainda em estratificação única com exsudato neutrofílico de permeio às áreas de degeneração balonosa envolvendo a lesão. Em um animal tratado (animal 4), observou-se, junto ao epitélio estratificado, exocitose de neutrófilos na sua camada superficial (Figura 19), que, por vezes, apresentava descamação de células superficiais.

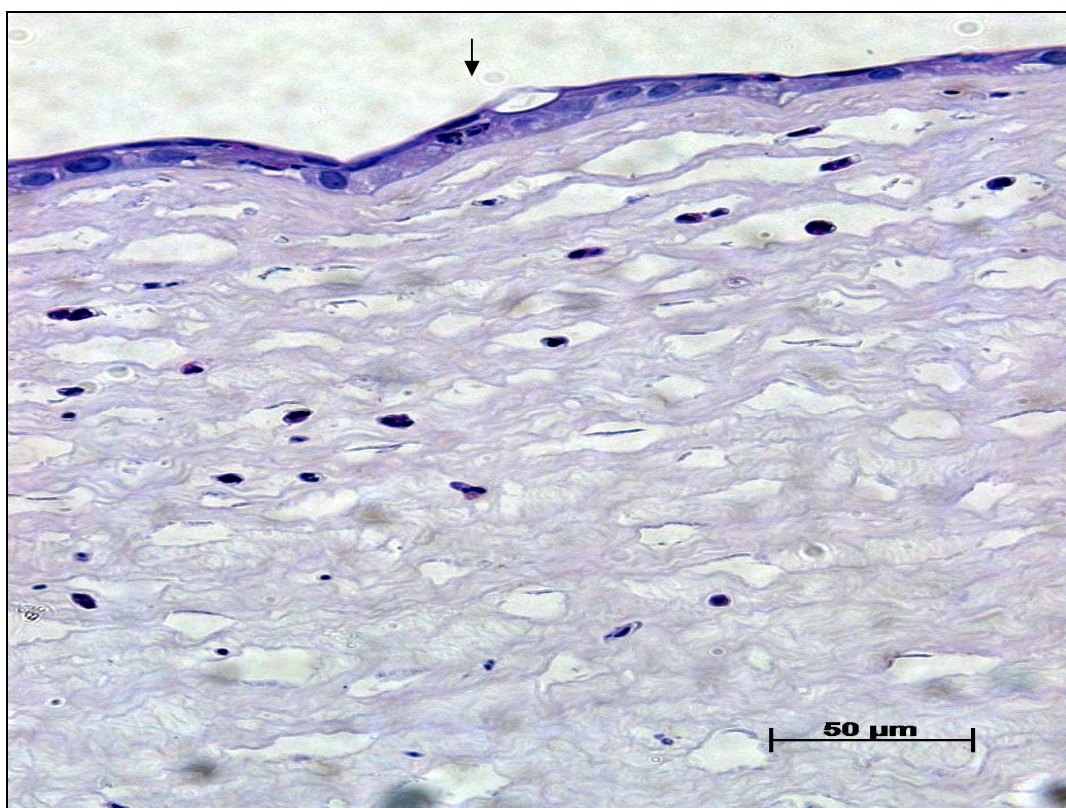


Figura 19: Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante mostrando epitélio de camada única com degeneração balonosa (seta) recobrindo o estroma corneal. (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.

Quanto aos eventos inflamatórios, observou-se que em ambos os grupos havia congestão vascular e inflamação aguda, caracterizada pela presença de polimorfonucleares subjacentes ao limbo (Figura 21). A reação inflamatória e a congestão vascular foram mais intensas nos olhos que receberam solução salina 0,9%.

No primeiro momento de avaliação (24 horas), as córneas controles apresentavam inflamação caracterizada por marginação e diapedese de polimorfonucleares, raros mononucleares e discreta exocitose no epitélio límbico. No mesmo período de avaliação, nas córneas tratadas observou-se menor componente inflamatório de polimorfonucleares, em mesma região (abaixo do epitélio límbico). Decorridas 55 horas, as córneas controles apresentavam moderada reação inflamatória e congestão vascular abaixo do epitélio límbico quando comparadas às córneas tratadas (Figura 22), onde tal reação foi discreta com raros mononucleares e polimorfonucleares.



Figura 20 - Fotomicrografia de córnea de coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 55 horas de tratamento com solução salina 0,9%, mostrando área central da lesão recoberta por uma única camada de células epiteliais parcialmente aderida ao estroma (setas). (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.

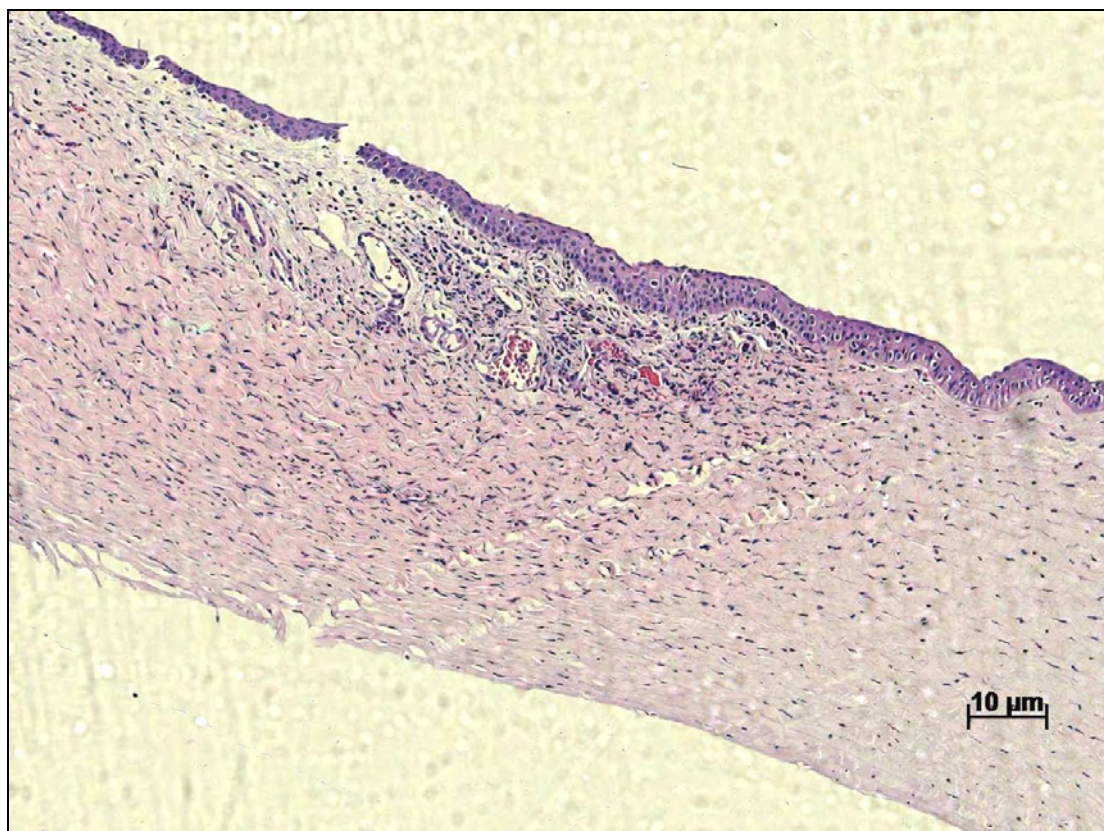


Figura 21 - Fotomicrografia de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 24 horas de tratamento com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, mostrando inflamação aguda de polimorfonucleados (PMN) e congestão vascular (HE: 5X). Jaboticabal, 2009.

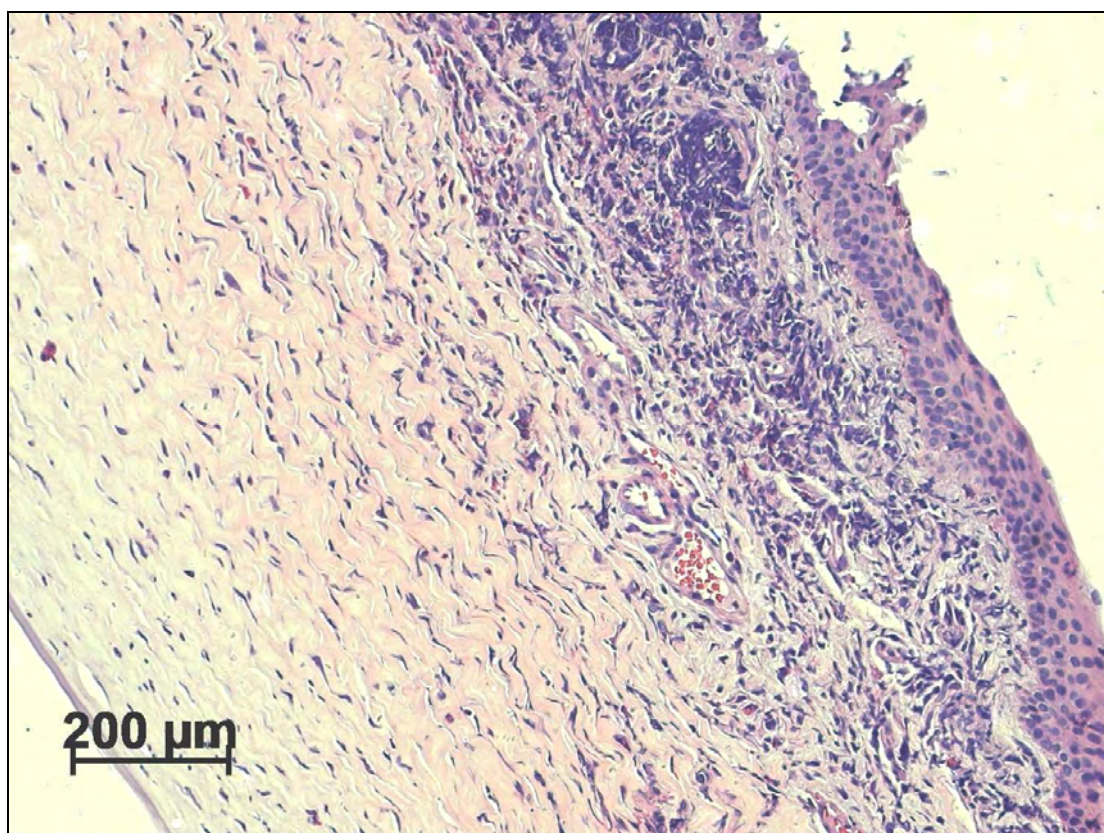


Figura 22: Fotomicrografia de córnea de coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, após 55 horas de tratamento com solução salina 0,9%, mostrando reação inflamatória moderada e congestão vascular abaixo do epitélio (HE: 20X). Jaboticabal, 2009.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura

Nas primeiras 24 horas, observou-se epitélio migrando sobre a área ulcerada, em todas as córneas. Nos controles, a borda epitelial apresentou-se menos descamada, comparativamente aos tratados (Figura 23). Decorridas 55 horas da abrasão química, todas as córneas apresentaram-se re-epitelizadas formando um mosaico de células poligonais de tamanhos variados. Nos olhos tratados, observou-se epitélio com grau de descamação mais acentuado e com aspecto menos aveludado, comparativamente aos controles (Figura 23).

Em maior aumento, foi possível observar microvilosidades, que se concentraram de forma mais densa em células mais claras (com menor reflexo de elétrons), em ambos os grupos. Notaram-se, ainda, crateras centrais à maioria das células (Figura 24). A avaliação da densidade das microvilosidades entre os olhos tratados e os controles, diferiu significativamente ($p = 0,03$), sendo maior nos olhos controle. Figura 25e apêndice 8.

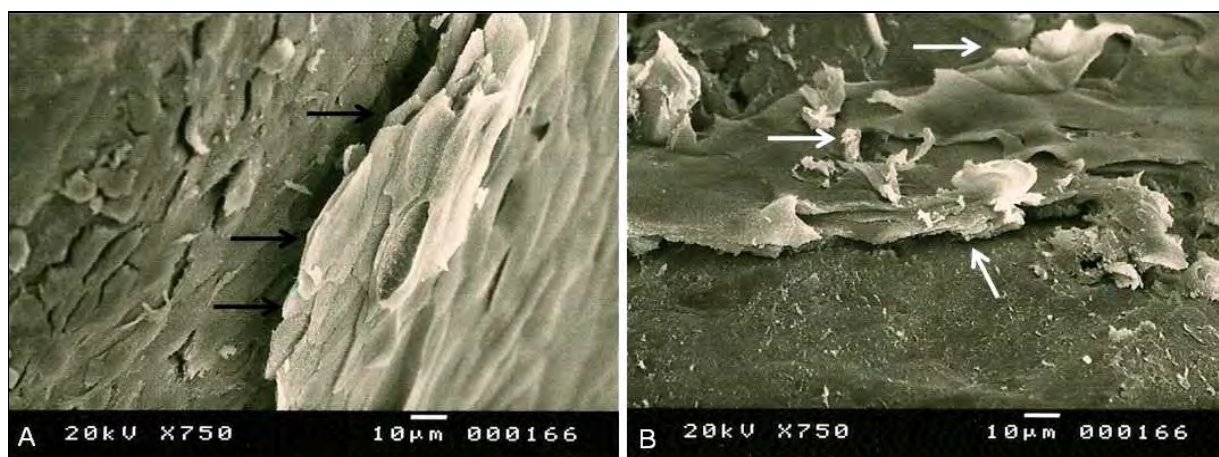


Figura 23 – Eletronmicrografia de varredura de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, 24 horas após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Em A, observa-se a migração do epitélio sobre o estroma acelular em olho controle (setas pretas). Em B, nota-se descamação de células periféricas migrando sobre o estroma, em olho tratado com cetorolaco de trometamina (setas brancas). Barra=10µm. Jaboticabal, 2009.



Figura 24 – Eletronmicrografia de varredura de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia, 55 horas após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Em A e B, observa-se aspecto poligonal das células epiteliais superficiais formando um mosaico. Em A, superfície corneal de olho controle mostrando aspecto mais aveludado (setas brancas), comparativamente à córnea de olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (B), que apresenta aspecto mais liso e descamado (setas pretas). Barra=10µm. Jaboticabal, 2009.

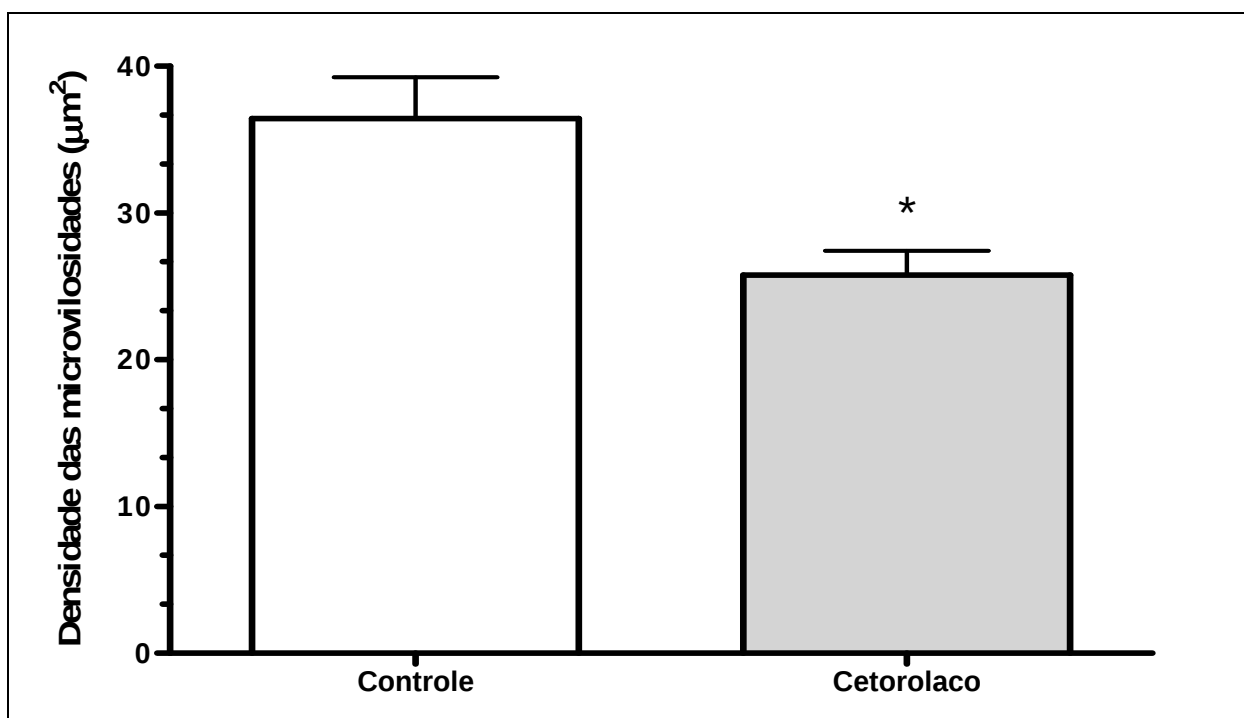


Figura 25 - Média e erro* padrão dos valores mensurados, relativamente à densidade das microvilosidades, 55 após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Teste T Student pareado ($p = 0,03$)*. Jaboticabal, 2009.

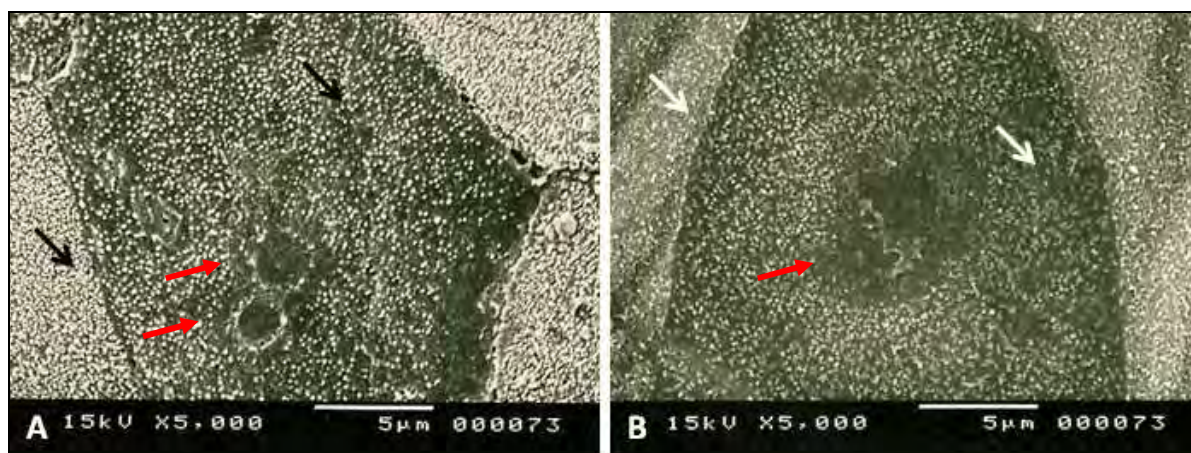


Figura 26 – Eletronmicrografia de varredura de córnea de coelho macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branca, 55 horas após abrasão química com NaOH a 1 mol/L. Em A, nota-se maior densidade de microvilosidades sobre a superfície das células epiteliais de olho controle (setas pretas), comparativamente, a olho tratado (B) com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (setas brancas). Em todos os olhos, observaram-se crateras centrais na maioria das células (setas vermelhas). Barra=5µm. Jaboticabal, 2009.

6. DISCUSSÃO

Optou-se por se estudarem os efeitos do cetorolaco de trometamina a 0,5%, sem conservante, em córneas ulceradas pelo hidróxido de sódio 1 mol/L. Bons resultados foram obtidos com o fármaco, em olhos acometidos por uveíte, ceratites ulcerativas, conjuntivite alérgica, degeneração macular, no pós-operatório de cirurgias refrativas, da facoemulsificação e no da correção do estrabismo (WHATERBURY & FACH, 2006, TRATTLER & MCDONALD, 2007, SCHECHTER, 2008), motivaram fazê-lo.

Soluções oftálmicas, em sua maioria, são dotadas de conservantes, introduzidos para prevenir a replicação de contaminantes que diminuem a meia vida dos agentes e suscitam infecções secundárias (EPSTEIN et al., 2009). Na presente pesquisa, utilizou-se a formulação comercial, sem cloreto de benzalcônio (preservativo), que apresenta propriedade epiteliotóxica (GUO et al., 2007; EPSTEIN et al., 2009). Na córnea, o cloreto de belzalcônio enseja perda aguda de adenosina trifosfato, com concomitante defosforilação da miosina de cadeia leve, necessária à contração da actina do citoesqueleto, responsável pela manutenção da integridade da barreira epitelial e da adesão e migração das células epiteliais (GUO et al., 2007). Evitaram-se os antibióticos por sua epiteliotoxicidade, notadamente das quinolonas e dos aminoglicosídeos (CHO, COVINGTON & CINTRON, 1990; HENDRIX, WARD & BARRNHILL, 2001; McDERMON, WHEATER, 2006).

Ling & Combs (1987) demonstraram que, apesar da solução de cetorolaco de trometamina a 0,5% ser absorvida para a grande circulação, concentrações elevadas no humor aquoso poderiam ser atingidas, comparativamente ao plasma. Outrossim, que

concentrações teciduais foram mais elevadas na córnea e na esclera do que na lente, decorrida 1 hora das instilações.

Coelhos com córneas desepitelizadas mecanicamente apresentaram reduzida absorção corneal do fármaco, quando tratados com cetorolaco de trometamina acrescido do preservativo cloreto de benzalcônio/EDTA. Animais tratados com o mesmo agente, livre de preservativo, apresentaram absorção corneal significativamente mais elevada (MADHU et al., 1996). Embora se tenha comprovado que concentração inferior do mesmo agente (0,1%) logrou o mesmo efeito em uveítes, utilizou-se a comercial a 0,5%, por ser a única disponível no Brasil (WHATERBURY & FLACH, 2006).

Os parâmetros clínicos não diferiram significativamente antes e após a instilação de 30µL de cetorolaco de trometamina a 0,5%, sem conservante. Relativamente à pressão ocular (PO), os dados observados divergiram dos descritos por Krohne, Gionfriddo & Morrison, (1998), que observaram elevação significativa da PO, após utilizarem, localmente, o flurbiprofeno (AINE) em cães. Em coelhos, desconhecem-se publicações que reportem o efeito de diferentes anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais sobre a PO. Admite-se que ambas as isoformas, cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2) estejam presentes no epitélio secretor não pigmentar de seres humanos saudáveis, justificando a ocorrência de glaucoma induzido pelo uso local de corticosteróides (MAIHÖFNER et al., 2001).

Isoformas de COX-1 e COX-2 foram encontradas na íris de coelhos saudáveis e com glaucoma, assim como no corpo ciliar de indivíduos saudáveis (RADI & RENDER, 2008), tais informações reforçam o interesse pela investigação levada a efeito no presente estudo, relativamente à PO, após o uso de um agente com comprovada ação inibitória da COX. Em seres humanos saudáveis, assim como em glaucomatosos, o uso local ou

sistêmico de cetorolaco de trometamina não alterou a pressão intraocular (COSTAGLIOLA et al., 2008).

Avaliou-se a região periférica à área ulcerada, pois, apesar da córnea apresentar maior sensibilidade na sua região axial, a região apresentava-se necrosada devido ao trauma químico (GOOD et al., 2003; KAPS, RICHTER & SPIESS, 2003). No que concerne o limiar de sensibilidade, os resultados não se alteraram, antes e após a instilação do fármaco. Resultados reportados após o uso local de cetorolaco e de outros AINEs, em seres humanos saudáveis, avaliados com o estesiômetro de Cochet-Bonnet, são controversos (SEITZ et al., 1996; SUN & GIMBEL, 1997; NARVÁEZ et al., 2002; ACOSTA et al., 2007). Narváez et al. (2002), não observaram alteração significativa após utilizarem, localmente, cetorolaco de trometamina ou diclofenaco sódico. Demonstrou-se existir redução significativa da sensibilidade corneal após o uso dos mesmos agentes, sendo o efeito significativamente maior em indivíduos negros da espécie humana, comparativamente aos brancos (SEITZ et al., 1996). Em outra pesquisa, constatou-se que instilações crescentes dos mesmos fármacos elevam o limiar de sensibilidade corneal, comparativamente a instilações únicas (SUN & GIMBEL, 1997). Aragona et al. (2000), ao avaliarem o efeito local da indometacina, do diclofenaco, do flurbiprofeno e do cetorolaco de trometamina, sobre o limiar de sensibilidade corneal mecânico (Cochet-Bonnet), constaram que apenas o diclofenaco induziu à diminuição significativa do parâmetro.

Em gatos saudáveis tratados com cetorolaco de trometamina ou com outros anti-inflamatórios não esteroides, o limiar de sensibilidade corneal mecânico não divergiu significativamente, antes e após instilações de cetorolaco de trometamina (ACOSTA et al., 2007). Os mesmos autores, todavia, constataram redução da condução de impulsos elétricos na córnea, após estímulo químico local com gás carbônico (CO₂) (ACOSTA et al.,

2007). Em seres humanos saudáveis, o uso local de diclofenaco atenuou o limiar de sensibilidade corneal, após estímulo mecânico, térmico e químico (CO₂). Relativamente ao flurbiprofeno, observou-se discreta diminuição do limiar de sensibilidade corneal a estímulos mecânico e químico, mas não a estímulos térmicos (ACOSTA et al., 2007). Em coelhos saudáveis, encontrou-se uma única publicação quanto ao limiar de sensibilidade corneal após o uso local de diclofenaco, em que não se observaram diferenças antes e após a instilação do agente (LOYA et al., 1994).

Em seres humanos, a quantificação do limiar de sensibilidade corneal é influenciada por fatores, como idade, ciclo hormonal, período circadiano, umidade relativa, temperatura ambiente, coloração da íris, uso de lentes de contato, fármacos, cirurgias, doenças oculares como uveíte, glaucoma, ceratite herpética, ceratoconjuntivite seca, tipo de estesiômetro empregado e habilidade do operador (BELMONTE et al., 2004). Em cães, condições como 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; WILLIAMS et al., 2007). Considerando-se que todos os coelhos utilizados no experimento eram machos saudáveis, da mesma raça, que as avaliações foram dadas nos mesmos períodos e por um mesmo avaliador, admitem-se como factíveis os resultados encontrados. Entretanto, poder-se-ia considerar período de adaptação e a metodologia empregada por dois dias. Períodos de adaptação mais prolongados, entretanto, poderiam oferecer resultados basais diferentes.

Optou-se por se avaliar a região central da córnea. Estudos prévios publicados reportaram-se a ela região como a mais sensível em coelhos, em seres humanos, cães, gatos, cavalos e em cobaias, por sua maior densidade de terminações axonais (ROZSA &

BEUERMAN, 1992; GOOD et al., 2003; KAPS & RICHTER, 2003; TROST, SKALICKY & NELL, 2007; KALF, UTTER & WOTMAN, 2008).

Relativamente ao número de troncos nervosos presentes no estroma e ao limiar de sensibilidade, a córnea de seres humanos responde mais intensamente (30 a 80 troncos nervosos), seguida pela dos gatos (16 a 20 troncos nervosos), dos coelhos (12 a 16 troncos), sendo a dos cães a menos sensível (13-14 troncos) (ZAEDER & WEDDELL, 1951; CHA-LING, 1989; ROZSA & BEURMAN, 1982).

Após abrasão química com hidróxido de sódio 1 mol/L, o limiar de sensibilidade corneal foi mais elevado nos olhos tratados com ceterolaco 1 mol/L, porém, não diferiram significativamente dos controles. Houve quem se reportasse aos mesmos resultados, em córneas sadias de coelhos e em outras submetidas a ceratectomia lamelar, quando se usou o diclofenaco sódico (LOYA et al., 1994). Phillips et al. (1996) não observaram redução significativa na concentração corneal de prostaglandina E₂ (PGE₂) e de leucotrieno B₄, em coelhos submetidos a cirurgia refrativa e tratados com ceterolaco de trometamina a 0,5%. Em contrapartida, notificaram que os animais tratados com o diclofenaco a 0,1%, ou com fluorometolona a 0,1%, apresentaram valores de PGE₂ substancialmente reduzidos.

Comparativamente à conjuntiva, a córnea, a lente e a retina apresentam capacidades reduzidas em sintetizar ciclooxygenases e metabólitos do ácido aracdônico (RADI & RENDER, 2008). Tal condição pode justificar a não significância estatística dos resultados nos olhos tratados com ceterolaco de trometamina 0,5%, sem conservante. O limiar de sensibilidade corneal com o estesiômetro de Cochet-Bonnet é mais difícil de ser demonstrado em córneas ulceradas quimicamente, dada a perda significativa da inervação nociceptora (LEEUW & CHAN, 1989). Relativamente, a análise dos resultados mostrou

coeficientes de variação elevados em córneas ulceradas, comparativamente às saudáveis. A avaliação do limiar de sensibilidade corneal para métodos térmico e químico, poderia, quem sabe, resgatar valores mais elevados nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, conquanto, aproximadamente, 70% das fibras sensoriais da córnea são de origem polimodal (BELMONTE, ACOSTA & GALLAR, 2004). A avaliação quanto limiar de sensibilidade corneal resultou, nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, em acréscimo de 50% reafirmando o seu bom efeito analgésico. A elevação do limiar de sensibilidade corneal em 37%, nos olhos controle, em comparação ao obtido no período basal, mesmo que sem significância estatística, justifica-se pela perda substancial de terminações nervosas decorrente da abrasão cáustica (Leeuw & Chan, 1989).

Trinta horas após as abrasões, o limiar de sensibilidade corneal de ambos os grupos, assim como os demais sinais clínicos avaliados, exibiram valores próximos aos basais o que pode ser justificado pela re-epitelização das córneas com consequente re-inervação. Leeuw & Chan (1989) admitiram que a reparação da inervação corneal se estabeleça passadas de 2,5 a 4 semanas da injúria por álcali, em coelhos. Na sua pesquisa eles empregaram o estesiômetro de Cochet-Bonnet, com o filamento fixo em 15,9 g/mm², diferentemente do que fora empregado no presente estudo, em que utilizaram-se pressões crescentes (g/mm²).

O protocolo empregado para confecção das úlceras corneais, hidróxido de sódio 1 mol/L, mostrou-se factível em 100% dos animais, dados que corroboram com os de outros autores (SAIKA et al., 1995; CAMPOS et al., 2003; SOSNE et al., 2005, HE et al., 2006, SHAHRIARI et al., 2008; KAWAMURA et al., 2008). Reconhece-se a ação do nitrato de prata, da fucodina e do n-heptanol como agentes químicos capazes de produzir abrasão

corneal (MAHONEY & WHATERBURY, 1985; LEEUW & CHAN, 1989; CAMPOS et al., 2003; WENK & HONDA, 2003; JENSEN et al., 2005; BRUNELLI et al., 2007).

Embora apenas às 14 e às 20 horas das abrasões químicas, o diâmetro da área ulcerada tenha diferido significativamente, entre os olhos tratados e os controles, as córneas controle re-epitelizaram, em média, 20 por cento mais rapidamente. Constatou-se o mesmo ao se avaliar a velocidade média de re-epitelização. Tais dados sugerem que a substância, mesmo sem preservativo, é epiteliotóxica por provável alteração em seu citoesqueleto (AGRAWAL & TSAI, 2003).

A velocidade média de re-epitelização dos olhos controle foi 16 $\mu\text{m}/\text{hora}$ mais rápida, comparativamente a outro estudo em que se utilizaram os mesmos métodos (SHAHRIARI et al., 2008).

A existência de significância estatística entre o diâmetro da área ulcerada, observada apenas entre 14 e 20 horas após as abrasões, pode estar relacionada com a fase de pico na síntese e incorporação de leucina e de glicosaminoglicanos (ZIESKE & GIPSON, 1986). No presente estudo a velocidade média com que as córneas controles (82,47 $\mu\text{m}/\text{hora}$) se re-epitelizaram corrobora com os achados obtidos em outro estudo (80,00 $\mu\text{m}/\text{hora}$) realizado em coelhos com úlceras com 0,65 mm de diâmetro. Ademais, mostrou-se que o diâmetro da área ulcerada interfere com a velocidade de re-epitelização nas primeiras 30 horas (MATSUDA, UBELS & EDELHAUSER, 1985). A ocorrência de tal, poderia justificar porque, na presente pesquisa, a velocidade de re-epitelização dos olhos controle foi, em média, 16 $\mu\text{m}/\text{hora}$ mais rápida, quando comparada com os resultados de outro estudo, onde abrasões químicas com 5 mm de diâmetro foram realizadas em coelhos (SHAHRIARI et al., 2008).

A re-epitelização corneal pode ser dividida em três fases. Na primeira, os hemidesmossomos são perdidos, formando-se uma adesão provisória, denominada de contato focal. Durante esta fase, as células epiteliais se achatam e migram como um folheto intacto para cobrir a área desnuda, sendo ela não dependente de proliferação celular. Durante a segunda fase, as células distais à margem ulcerada se proliferam, aproximadamente 5 horas após o insulto, a uma velocidade média de 60-80 $\mu\text{m}/\text{hora}$, repovoando a área desnuda, tem-se o início da estratificação e da diferenciação celulares. Na terceira, os hemidesmossomos e a matriz extracelular são reconstituídos (AGRAWAL & TSAI, 2003).

Pereira et al. (2001) estudaram, em coelhos, os efeitos do cetorolaco de trometamina e do seu preservativo sobre a epitelização de córneas desbridadas mecanicamente, após queimadura por álcool etílico a 95%. Resultados semelhantes aos da presente pesquisa foram reportados. Os olhos tratados com o AINE, ainda se apresentavam ulcerados, decorridas 60 horas das abrasões, diferentemente dos controles e daqueles tratados com o preservativo (cloreto de benzalcônio 0,01% e associações).

Na presente pesquisa, todavia, os olhos tratados apresentaram-se epitelizados 55 horas das abrasões. Não há como saber se o retardo decorreu do maior diâmetro das lesões produzidas por Pereira et al. (2001) (7,5mm) ou da ação do preservativo empregado por aqueles autores. Embora Pereira et al. (2001) não houvessem observado retardo na re-epitelização das córneas, houve mais apoptose, no grupo tratado.

A infiltração de polimorfonucleares é necessária para re-epitelização-se, notadamente neutrófilos, que secretam fatores de crescimento (trefonas) capazes de estimular a fibroplastia. O infiltrado inflamatório influencia as células residentes, pela

secreção de citocinas, que modulam a reparação tecidual (GAN, FAGERHOLM & KIM, 1999).

Após abrasão corneal, a migração de neutrófilos para o estroma ocorre sob duas condições. A primeira é dependente de moléculas de adesão (P e E-selectina) e de CD18. A segunda é também dependente de moléculas de adesão, cuja migração de leucócitos promove a re-epitelização (ZHIJIE, BURNS & SMITH, 2006). Na presente pesquisa, embora não quantificada, a infiltração leucocitária pareceu ser maior em olhos controle. Achados similares foram descritos após o uso do cetorolaco de trometamina, com preservativo, em úlceras experimentais em coelhos. A inibição da infiltração leucocitária ensejada pelo cetorolaco de trometamina parece atuar sobre a re-epitelização corneal (Pereira et al., 2001).

A reparação cicatricial é complexa e influenciada por proteínas e fatores de crescimento contidos na matriz extracelular. Na reparação de córneas aviltadas por álcalis, miofibroblastos expressam níveis elevados de colágeno do tipo I, de actina alfa de músculo liso e de metaloproteinases. Admite-se a participação de pequenas quantidades de prostaglandina sintetase-1 em córneas saudáveis de coelhos e que essas elevam-se após abrasões químicas. Não se esclareceu, todavia, se essa substância exerce papel importante na reparação cicatricial (KAWAMURA et al., 2008). Avaliá-la poderia esclarecer as razões pelas quais o cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante, retardou a re-epitelização.

Embora ao término das avaliações, ambos os grupos tivessem evoluído para re-epitelização, acredita-se que uma avaliação temporal mais prolongada poderia oferecer dados importantes. Yew et al. (2000) constataram que a expressão do antígeno proliferador de núcleo celular (PCNA) atinge o seu máximo em 48 horas após

desbridamento epitelial em córneas de coelhos. Os mesmo autores consideraram que o depósito do período crítico, para re-epitelização, seja de 48 horas. Aos 7 dias o epitélio corneal ainda apresenta sinais de imaturidade, dada a expressão de citoceratina de baixo peso molecular e a elevada expressão do fator de crescimento epidérmico do limbo (YEM et al., 2000). Outro estudo demonstrou que, mesmo re-epitelizadas, córneas de cobaias submetidas a abrasões químicas não apresentam a membrana basal em condições ótimas, devido à expressão descontínua de laminina e de colágeno tipo IV sob o epitélio recém formado (SAIKA et al., 1995). Frente a assertiva, poder-se-ia especular a ocorrência de úlceras indolentes nos animais aqui estudados, caso período superior a 48 horas fosse adotado, notadamente nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante.

Do início ao término das avaliações, observou-se perda de transparência da região paracentral da córnea em todos os olhos avaliados, decorrente da necrose de ceratócitos estromais e da desorganização das lamelas de colágeno, como fora confirmado à histologia. Kato, Saika & Ohnishi (2006) informaram que após queimadura com álcali, tem-se a substituição de constituintes da membrana basal da córnea de coelhos. A fração alfa-5 do colágeno tipo IV, responsável por manter a transparência corneal é substituída por frações alfa-1 e -2, que não se expressam em córneas saudáveis.

Constatou-se, na maioria dos períodos estudados, redução dos parâmetros qualitativos (blefarospasmo e hiperemia conjuntival), nos animais tratados localmente com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante. A maior manifestação do blefarospasmo, observada 20 horas após as lesões, nos olhos tratados, se deve, provavelmente ao término do efeito do fármaco, que fora instilado 12 horas antes. A

ausência de blefarospasmo, constatada decorridas 28 horas, ratifica o efeito analgésico da substância por, aproximadamente, 8 horas.

No que concerne à hiperemia conjuntival, não se notou redução decorridas 20 horas, permitindo supor que o desconforto conjuntival ensejado pelas abrasões não manteve correlação. Pela natureza vascularizada da conjuntiva e por sua alta capacidade em sintetizar cicloxigenases e metabólitos do ácido aracdônico (RADI & RENDER, 2008), entende-se a ação inibitória do cetorolaco de trometamina, reduzindo significativamente a intensidade de manifestação dos parâmetros de blefarospasmo e hiperemia conjuntival.

A avaliação, por microscopia eletrônica de varredura, permitiu verificar, às 24 horas das abrasões, que a qualidade das células migrando sobre o estroma acelular foi prejudicada nos olhos tratados com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante. Constatou-se que 48 horas após queimadura por álcali, o fenótipo das células epiteliais de superfície e das microvilosidades corneais já estava reconstituído, notadamente nos olhos controle.

Considerando-se o que fora proposto por Julio et al. (2008), foi possível quantificar a densidade de microvilosidades. Observou-se que o cetorolaco de trometamina retardou a reparação significativamente.

A densidade de microprojeções (μm^2) das córneas estudadas foi, respectivamente, 52% e 32% maior nos olhos controles e tratados, em comparação à densidade de microprojeções (μm^2) observada em córneas de coelhos saudáveis, à similitude do que fora mostrado por Julio et al., 2008.

7 – CONCLUSÃO

Considerando a maneira como a pesquisa foi concebida e levando-se em conta as injunções do meio onde ela foi conduzida, é possível admitir que, mesmo sem a adição de conservantes e a despeito do bom efeito analgésico, o cetorolaco de trometamina a 0,5%, sem conservante, retarda a reparação cicatricial do epitélio corneal em coelhos submetidos a abrasões com hidróxido de sódio 1 mol/L.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA M. C. et al. Changes in mechanical, chemical, and thermal sensitivity of the cornea after topical application of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.46, n.1, p.282-286b, 2005.

ACOSTA M. C., et al. Comparative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nepafenac on corneal sensory nerve fibers responding to chemical irritation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science.** v.48, n.1, p.182-188a, 2007.

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

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

ARAGONA P, TRIPODI G, SPINELLA R, LAGANÀ E, FERRERI G. The effects of the topical administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on corneal epithelium and corneal sensitivity in normal subjects. **Eye.** v.14, p.206-210, 2000.

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

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.

BERNARDINI, M.C.P.; NASSARALLA, B.R.A. Redução da Sensibilidade corneana humana com o uso de cetorolaco de trometamina. **Ver. Brás. Oftal.**, v.60, n.7, p.497-503, 2001.

BOBERG-ANS, J. Experience in clinical examination of corneal sensitivity. **British Journal of Ophthalmology.** v.39, p.705-726, 1955.

BLOCKER T, HOFFMAN A, SCHAEFFER DJ, WALLIN JA. Corneal sensitivity and aqueous tear production in dogs undergoing evisceration with intraocular prosthesis placement. **Vet Ophthalmol.** v.10, n.3, p.147-154, 2007.

BONNET, R.; MILLODOT, M. Corneal aesthesiometry: its measurement in the dark. **American Journal of Optometry and Archives of the American Academy of Optometry.** v.43, p.238-243, 1966.

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

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.

CAMPOS, C. F.; JORGE, A. T.; TALIERI, I. C.; VICENTI, F. A. M.; TOLEDO-PIZA, E. LAUS, J. L. Ocular alkali lesions in dogs. Acetylcysteine and blood serum effects. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.40, n.1, p.36-44, 2003.

CLARK, T. P. The clinical pharmacology of cyclooxygenase-2 selective and dual inhibitors. **Veterinary Clinics Small Animals Practice**. n.36, p. 1061-1085, 2006.

CHANG-LING, T. Sensitivity and neural organization of the cat cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v.30, p. 1075-1082, 1989.

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.

COCHET, P.; BONNET, R. L'esthésiométrie cornéenne. Réalisation et intérêt pratique. **Bulletin des Sociétés d'Ophtalmologie de France**. p.541-550, 1961.

COHEN, R.; BEUERMAN, R.W.; GEBHARDT, B.M.; BAZAN, N.G. Comparason of the effect of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs with patching on corneal epithelial wound healing. **ARVO Annual Meeting**. Ft. Lauderdale, FL: 1995.

COSTAGLIOLA C, CAMPA C, PERRI P, PARMEGGIANI F, ROMANO MR, INCORVAIA C. Topical and oral ketorolac administration increases the intraocular pressure-lowering effect of latanoprost. **Current Eye Research**. v.33, n.5, p.477-482, 2008.

CULLEN CL, IHLE SL, WEBB AA, MCCARVILLE C. Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs. **Vet Ophthalmol**. v.8, n.4, p.215-224, 2005.

DUVALL, B., KERSHNER, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Ophthalmic Medications and Pharmacology**. 2.ed., USA: SLACK Incorporated, 2006. cap. 8, p. 64-65.

EPSTEIN, S. P.; AHDOOT, M.; MARCUS, E.; ASBELL, P. Comparative Toxicity of Preservatives on Immortalized Corneal and Conjunctival Epithelial Cells. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 25, n. 2, 2009.

FITZGERALD, K. T.; BRONSTEIN, A. C.; FLOOD, A. A. "Over-the-counter" drug toxicities in companion animals. **Clinical Techniques in Small Animals Practice**. n.21, p.215-226, 2006.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; KIM, H. Effect of Leukocytes on Corneal Cellular Proliferation and Wound Healing. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.40, n.3, 1999.

GIULIANO, E. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. **Veterinary Clinics Small Animals Practice** n.32, p.707-723, 2004.

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.

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

GOOD, K. et al. Corneal sensitivity in dogs with diabetes mellitus. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.1, p.7-11, 2003

GUO, Y.; SATPATHY, M.; WILSON, G.; SRINIVAS, S. P. Benzalkonium Chloride Induces Dephosphorylation of Myosin Light Chain in Cultured Corneal Epithelial Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.48, p.2001-2008, 2007

HADDOX, J.L.; PFISTER, R.R.; SOMMERS, C.L.; BLALOCK, J.E.; VILLAIN, M. Inhibitory effect of a complementary peptide on ulceration in the alkali-injured rabbit cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.42, n.12, p.2769-2775, 2001.

HE, J.; BAZAN, N.G.; BAZAN, H.E. Alkali-induced corneal stromal melting prevention by a novel platelet-activating factor receptor antagonist. **Arch Ophthalmol**. v.124, n.1, p.70-78, 2006.

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. **American Journal Veterinary Research**, v62, 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.

HERSH, P. S.; RICE, B. A.; BAER, J. C.; WELLS, P. A.; LYNCH, S. E.; McGUIGAN, L. J. B.; FOSTER, S. Topical nonsteroidal agents and corneal wound healing. **Arch. Ophthalmol**. v. 108, p.577-583, 1990.

ISNARD, N.; BOURLES-DAGONET, F.; ROBERT, L.; RENARD, G. Studies on corneal wound healing. Effect of fucose on iodine vapor-burnt rabbit corneas. **Ophthalmologica**. v.219, n.6, p.324-333, 2005.

JENSEN, H.; ZEROUALA, C. CARRIER, M. SHORT, B. Comparison of ophthalmic gatifloxacin 0.3% and ciprofloxacin 0.3% in healing of corneal ulcers associated with *Pseudomonas aeruginosa*-induced ulcerative keratitis in rabbits. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.** v.21, n.1, p. 36-43, 2005.

JULIO, G.; MERINDANO, M. D.; CANALS, M.; RALLO, M. Image processing techniques to quantify microprojections on outer corneal epithelial cells. **Journal of Anatomy.** v.22, n.6, p.879-886. 2008.

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

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. **Jpn J Ophthalmol.** v. 50, n.2, p. 90-95, 2006.

KATZUNG, B. G. Fármacos Anti-Inflamatórios Não-Esteróides. **Farmacologia Básica e Clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 482, 2005.

KALF KL, UTTER ME, WOTMAN KL. Evaluation of duration of corneal anesthesia induced with ophthalmic 0.5% proparacaine hydrochloride by use of a Cochet-Bonnet aesthesiometer in clinically normal horses. **Am J Vet Res.** v.69, n.12, p.1655-1658, 2008.

KAWAMURA, A.; TATSUGUCHI, A.; ISHIZAKI, M.; TAKAHASHI, H.; FUKUDA, Y. Expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 in Fibroblasts of Rabbit Alkali-Burned Corneas. **Cornea.** v.27, n.10, p.1156-1163, 2008.

KROHNE, S. G.; GIONFRIDDO, J.; MORRISON, E. A. Inhibition of pilocarpine-induced aqueous humor flare, hypotony, and miosis by topical administration of anti-inflammatory and anesthetic drugs to dogs. **Am-J-Vet-Res.** v.59, n.4, p.482-488, 1998.

JOO M.J.; YUHAN K.R.; HYON J.Y.; LAI H.; HOSE S.; SINHA D.; O'BRIEN T.P. The effect of nerve growth factor on corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis. **Archives of Ophthalmology.** v.122, n.9, p.1338-1341, 2004.

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.

LEEuw, A.M.; CHAN, K.Y. Corneal nerve regeneration. Correlation between morphology and restoration of sensitivity. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v.30, n.9, p.1980-1990, 1989

LING TL, COMBS DL. Ocular bioavailability and tissue distribution of [14C] ketorolac tromethamine in rabbits. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.76, n.4, p.289-294, 1987.

LINN, J.C. RAPUANO, C.J.; LAISBONP.R. et al. Corneal melting associated with the use of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs after ocular surgery. **Archives of Ophthalmology**, v.118, n.8, p.1129-1132, 2000.

LOYA N, BASSAGE S, VYAS S, DEL CERRO M, PARK SB, AQUAVELLA JV. Topical diclofenac following excimer laser: effect on corneal sensitivity and wound healing in rabbits. **J Refract Corneal Surg**. v.10, n.4, p.423-427, 1994.

MADHU C, RIX PJ, SHACKLETON MJ, NGUYEN TG, TANG-LIU DD. Effect of benzalkonium chloride/EDTA on the ocular bioavailability of ketorolac tromethamine following ocular instillation to normal and de-epithelialized corneas of rabbits. **Journal of Pharmacy Sciences**. v.85, p.415-418, 1996.

MAHONEY, J.M.; WATERBURY, L.D. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. **Curr. Eye Res**. v.4, n.5, p.531-535, 1985.

MAIHÖFNER, C.; SHLÖTZER-SCHREHARDT, U.; GÜHRING, H.; ZEILHOFER, H. U.; NAUMANN, G. O. H.; PAHL, A.; MARDIN, C.; TAMM, E. R.; BRUNE, K. Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in Normal and Glaucomatous Human Eyes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v.42, p.2616-2624. 2001.

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.

MARSHALL, J. L.; STANFIELD, K.M.; LEE, S.; KHAN, N. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in glaucomatous dog eyes. **Veterinary Ophthalmology**. v. 7, n. 1, p.59-62, 2004.

MATSUDA, M.; UBELS, J.L.; EDELHAUSER, H.F. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.26, n.6, p. 897-900, 1985.

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.22, S22-S25, 2006

MILLODOT, M. Do blue-eyed people have more sensitive corneas than brown-eyed people? **Nature**. V.255, p.151-152, 1975.

MILLODOT, M. The influence of age on the sensitivity of the cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v.16, p.240-242, 1977.

MILLODOT, M. The influence of pregnancy on the sensitivity of the cornea. **British Journal of Ophthalmology**. v.61, p.646-649, 1977.

MILLODOT, M.; LARSON, W. New measurements of corneal sensitivity: a preliminary report. **American Journal of Optometry and Archives of the American Academy of Optometry** v. 46, p.261-265, 1969.

MOREIRA, L.B.; KASETSUWAN, N.; SANCHEZ, D. et al. 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.

MURPHY, C.J.; MARFURT, C.F.; McDERMOTT, A. et al. 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.

NARVÁEZ J, KROLL P, GUZEK JP. Effect of topical diclofenac and ketorolac on patient discomfort and corneal sensitivity. **Journal of Refractive Surgery**. v.18, n.2, p.145-148, 2002.

PAPICH, M. G. Pharmacologic Considerations for Opiate Analgesic and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.30, n.4, p.815-837, 2000.

PAPICH, M. G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in small animals. **Veterinary Clinics Small Animals Practice**. n.38, p.1243-1266, 2008.

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, 138-141, 1994.

RADI, Z. A., RENDER, J. A. The pathophysiologic role of cyclooxygenases in the eye. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. v.24, n.2, p.141-148, 2008.

RIBEIRO, A. P. **Efeitos do meloxicam e do carprofeno administrados por diferentes vias no controle da uveíte em cães (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758)**. Tese (mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, 2007.

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

SAIKA, S.; KOBATA, S.; HASHIZUME, N.; OKADA, Y.; YAMANAKA, O. Epithelial basement membrane in alkali-burned corneas in rats. Immunohistochemical study. **Córnea**. v.12, n.5, p.383-390, 1993.

SAIKA, S.; KOBATA, S.; HASHIZUME, N.; YAMANAKA, O.; OKADA, Y.; OOSHIMA, A. Type IV collagen in the basement membrane of the corneal epithelium after alkali burns in guinea pigs. **Ophthalmic Res**. v.27, n.3, p.129-135, 1995.

SAMUELSON, D.A. Ophthalmic anatomy. In: Gelatt KN (ed.). **Veterinary Ophthalmology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. p. 31–150.

SEITZ, B.; et al. Corneal Sensitivity and Burning Sensation. **Clinical Sciences**. v.114, p. 921-924, 1996.

SELLERS, R.S.; SILVERMAN, L.; KHAN, K.N. Cyclooxygenase-2 expression in the cornea of dogs with keratitis. **Veterinary Pathology**, v.41, n.2, p.116-121, 2004.

SHAHRIARI, H.A.; TOKHMEHCHI, F. REZA, M. HASHEMI, N.F. Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. **Cornea**. v.27, n.10, p.1148-1150, 2008.

SCHECHTER, B.A. Ketorolac tromethamine 0.4% as a treatment for allergic conjunctivitis. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. v.4, n.4, p.507-511, 2008.

SLATTER, D. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2005. 686p.

SOSNE, G.; CHRISTOPHERSON, P.L.; BARRETT, R.P.; FRIDMAN, R. Thymosin-beta4 modulates corneal matrix metalloproteinase levels and polymorphonuclear cell infiltration after alkali injury. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**. v.46, n.7, p.2388-2395, 2005.

SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 4. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2006.

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.

SUN R, GIMBEL HV. Effects of topical ketorolac and diclofenac on normal corneal sensation. **Journal of Refractive Surgery**. v.12, n.2, p.158-161, 1997.

SZUCS, P.A.; MASHED, A.H.; ALLEGRA, J.R. et al. Safety and efficacy of diclofenac ophthalmic solution in the treatment of corneal abrasions. **Annals of Emergency Medicine**, v.35, n.2, p.131-137, 2000.

THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.24 p.1442–1443, 1983.

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

VAN DER WOERDT, A. Management of intraocular inflammatory disease. **Clinical Techniques in Small Animal Practice.** v.16, n.1, p.58-61, 2001.

WARD, D. A.; FERGUSON, D. C.; KASWAN, R. L.; GREEN, K. Leukotrienes and Sensory Innervation in Blood-Aqueous Barrier Disruption in the Dog. **JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY.** v.8, n.1, p.1-8, 1992.

WATERBURY, D. L.; FLACH, A. J. Comparison of ketorolac tromethamine, diclofenac sodium, and loteprednol etabonate in an animal model of ocular inflammation. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.** v.22, n.3, p.155-159, 2006.

WATERBURY, D. L.; KUNYSZ, E. A.; BEUERMAN, R. Effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents on corneal wound healing. **J. Ocul. Pharmacol.** v.3, p. 43-54, 1987.

WEIGT, A.K. et al. Effects of cyclophotocoagulation with a neodimium: 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, Shaumburg,** v.63, n.6, p.906-914, 2002.

WENK, H.N.; HONDA, C.N. Silver nitrate cauterization: characterization of a new model of corneal inflammation and hyperalgesia in rat. **Pain.** v.105, n.3, p.393-401, 2003.

WILKIE, D. A., GEMENSKY-METZLER, A. J. Agents for intraocular surgery. **Veterinary Clinics Small Animals Practice.** n.34, p.801-823, 2004.

WILLIAMS DL, PIERCE V, MELLOR P, HEATH MF. Reduced tear production in three canine endocrinopathies. **J Small Anim Pract.** v.48, n.5, p.252-256, 2007..

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

YING, G. et al. Benzalkonium Chloride Induces Dephosphorylation of Myosin Light Chain in Cultured Corneal Epithelial Cells. **SrinivasInvest Ophthalmol Vis Sci.** v.48, p.2001–2008, 2007.

YEW, D.T.; LAM, T.K.; TSANG, D.; AU, Y.K.; LI, W.W. TSO, M.O. Changes of cytochemical markers in the conjunctival and corneal epithelium after corneal debridement. **Cellular and Molecular Neurobiology.** v.20, n.4, p.465-482, 2000.

ZANDER, E.; WEDDELL, G. Observations on the innervation of the cornea. **Journal of Anatomy.** v.85, p.68-99, 1951.

ZHIJIE, L.; BURNS, A.R.; SMITH, C.W. Two Waves of Neutrophil Emigration in Response to Corneal Epithelial Abrasion: Distinct Adhesion Molecule Requirements. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.47, p. 1947-1955, 2006.

ZIESKE, J.D.; GIPSON, I.K. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.27, n.1, p.1-7, 1986.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Estatística descritiva da pressão intraocular (mmHg), antes (basal) e 10 minutos após a instilação de 30µL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córneas sadias de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

Pressão intraocular (mmHg)	
Basal	
Média ± erro padrão	15,04±0,70
Mínimo	8,00
Máximo	22,00
Coeficiente de variação	22,99%
Controle (olho direito)	
Média ± erro padrão	15,50±0,71
Mínimo	13,00
Máximo	18,00
Coeficiente de variação	11,36%
Cetorolaco (olho esquerdo)	
Média ± erro padrão	14,67±1,14
Mínimo	12,00
Máximo	19,00
Coeficiente de variação	19,12%
Valor de p*	1,00

*Análise de variância para medidas repetidas

Apêndice 2 - Estatística descritiva do limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), antes (basal) e após a instilação de 30 μL de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), em córnea sadia de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

	Limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2)
Basal	
Média $\pm$ erro padrão	0,80 $\pm$ 0,04
Mínimo	0,55
Máximo	1,00
Coeficiente de variação	21,15%
Controle	
Média $\pm$ erro padrão	0,86 $\pm$ 0,04
Mínimo	0,80
Máximo	1,00
Coeficiente de variação	11,92%
Cetorolaco	
Média $\pm$ erro padrão	0,94 $\pm$ 0,14
Mínimo	0,55
Máximo	1,40
Coeficiente de variação	38,93%
Valor de p*	1,00

*Análise de variância para medidas repetidas

Apêndice 3 - Estatística descritiva dos valores qualiquantitativos atribuídos ao blefarospasmo, em córneas tratadas com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química da com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

	4 horas	8 horas	20 horas	26 horas	30 horas
Controle					
Média± erro padrão	3,00	2,66±0,21	0,83±0,30	0,33±0,21	0,00
Mínimo	3,00	2,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	3,00	3,00	2,00	1,00	0,00
Coeficiente de variação	0,00%	19,36%	90,33%	154,92%	0,00%
Cetorolaco					
Média± erro padrão	0,16±0,16	0,00	1,16±0,54	0,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	1,00	0,00	3,00	0,00	0,00
Coeficiente de variação	244,95%	0,00%	113,93%	0,00%	0,00%
Valor de p*	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	1,00

*Teste Tukey

Apêndice 4 - Estatística descritiva dos valores do resultado qualiquantitativo atribuído à hiperemia conjuntival, em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

	4 horas	8 horas	20 horas	26 horas	30 horas
Controle					
Média± erro padrão	2,66±0,33	2,50±0,22	2,66±0,21	2,00±0,36	0,83±0,40
Mínimo	1,00	2,00	1,00	2,00	0,00
Máximo	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00
Coeficiente de variação	30,62%	21,91%	44,72%	19,36%	117,98%
Cetorolaco					
Média ± erro padrão	0,16±0,16	0,00	1,16±0,30	0,16±0,16	0,16±0,16
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	1,00	0,00	2,00	1,00	1,00
Coeficiente de variação	244,95%	0,00%	64,52%	244,95%	244,95%
Valor de p*	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	>0,05

*Teste Tukey

Apêndice 5 - Estatística descritiva dos valores de limiar de sensibilidade corneal (g/mm^2), em córneas tratadas com de cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

	4 horas	8 horas	20 horas	26 horas	30 horas
Controle					
Média± erro padrão	4,35±1,37	1,86±0,31	158±0,30	1,36±0,34	1,53±0,13
Mínimo	1,00	1,00	0,70	0,50	1,00
Máximo	10,30	2,80	2,80	2,80	1,80
Coeficiente de variação	77.38%	41.03%	46.65%	61.86%	21.30%
Cetorolaco					
Média± erro padrão	6,06±1,40	5,35±1,64	5,15±1,73	2,90±0,76	2,00±0,69
Mínimo	2,80	1,80	1,00	0,70	0,55
Máximo	10,30	10,30	10,30	5,10	5,10
Coeficiente de variação	56.65%	75.13%	82.31%	64.92%	84.83%
Valor de p*	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

*Teste Tukey

Apêndice 6 - Estatística descritiva quanto tempo de re-epitelização das úlceras, em córneas tratadas com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou de solução salina a 0,9% (OC), após cauterização com NaOH a 1 mol/L. em córnea de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

Tempo de re-epitelização (horas)	
Controle	
Média ± erro padrão	37,67±3,24
Mínimo	30,00
Máximo	50,00
Coeficiente de variação	21,08%
Cetorolaco	
Média ± erro padrão	53,33±1,05
Mínimo	50,00
Máximo	55,00
Coeficiente de variação	4,84%
Valor de p*	0,010

*Teste T Student pareado

Apêndice 7 - Estatística descritiva da velocidade média de re-epitelização das úlceras

($\mu\text{m/hora}$), em córneas tratadas com cetorolaco de trometamina 0,5%, sem conservante (OT) ou com solução salina a 0,9% (OC), após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

Velocidade média de re-epitelização ($\mu\text{m/hora}$)	
Controle	
Média $\pm$ erro padrão	82,47 $\pm$ 6,64
Mínimo	60,00
Máximo	100,00
Coeficiente de variação	19,74%
Cetorolaco	
Média $\pm$ erro padrão	56,36 $\pm$ 1,15
Mínimo	54,54
Máximo	60,00
Coeficiente de variação	5,00%
Valor de p*	0,016

*Teste T Student pareado

Apêndice 8 - Estatística descritiva da densidade de microvilosidades ($\mu\text{m}/\text{hora}$), em ambos nos grupos tratados e controle, 48 horas após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branca. Jaboticabal, 2009.

Densidade das microvilosidades (μm^2)	
Controle	
Média $\pm$ erro padrão	36,44 $\pm$ 2,83
Mínimo	31,14
Máximo	45,30
Coeficiente de variação	17,26%
Cetorolaco	
Média $\pm$ erro padrão	25,77 $\pm$ 1,65
Mínimo	21,70
Máximo	30,41
Coeficiente de variação	14,35%
Valor de p*	0,03

*Teste T Student pareado