RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 04/12/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

METRONIDAZOL NA ANGIOGÊNESE CORNEAL EM RATOS (*Rattus norvegicus*, variação *albinus, Wistar*)

Flor Diana Yokoay Claros Chacaltana

Médica Veterinária

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

METRONIDAZOL NA ANGIOGÊNESE CORNEAL EM RATOS (*Rattus norvegicus*, variação *albinus, Wistar*)

Flor Diana Yokoay Claros Chacaltana

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Aldrovani

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

2017

Claros-Chacaltana, Flor Diana Yokoay
C613m Metronidazol na Angiogênese Corneal mm Ratos (*Rattus Norvegicus,* Variação *Albinus, Wistar*) / Flor Diana Yokoay Claros Chacaltana. – – Jaboticabal, 2017
ix, 57 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: José Luiz Laus
Banca examinadora: João Antonio Tadeu Pigatto, Cláudia Valéria Seullner Brandão, Ivan Ricardo Martinez Pádua, Paola de Castro Moraes, Marcela Aldrovani Rodrigues
Bibliografia

1. Cauterização alcalina. 2. Neovascularização corneal. 3. metronidazol. 4. Rato. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617.7:599.323

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: METRONIDAZOL NA ANGIOGÊNESE CORNEAL EM RATOS (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar)

AUTORA: FLOR DIANA YOKOAY CLAROS CHACALTANA
ORIENTADOR: JOSÉ LUIZ LAUS
COORIENTADORA: MARCELA ALDROVANI RODRIGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARCELA ALDROVANI RODRIGUES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNICAMP / Campinas/SP

Prof. Dr. JOAO ANTONIO TADEU PIGATTO
Departamento de Medicina Animal / Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Porto Alegre/RS

Pós-doutorando IVAN RICARDO MARTINEZ PADUA
Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP

Profa. Dra. CLAUDIA VALERIA SEULLNER BRANDAO
Depto. de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / FMVZ/Unesp - Câmpus de Botucatu

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Flor Diana Yokoay Claros Chacaltana nascida em 28 de novembro de 1984 na cidade de Lima, Perú, filha de Jesús Manuel Claros Muñoz e Flor Esther Melchora Chacaltana Tanloc. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidad Alas Peruanas (Lima-Perú) em 2007. Atuou como médica veterinária na Clínica Veterinária Walac (Lima-Perú) até agosto de 2008. Em março 2011 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS/Brasil, sob orientação do professor doutor João Antonio Tadeu Pigatto, concluindo-o em fevereiro de 2013. Deu início ao curso de Doutorado no programa Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, SP/Brasil, em março de 2014, sob orientação do professor doutor José Luiz Laus. Realizou doutorado sanduiche na “University of Illinois Urbana-Champaign” no 2017, sob orientação da professora Bianca Da Costa Martins.

Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux.

Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.

Antoine de Saint-Exupéry

À Deus

À minha mãe Flor Chacaltanta Tanloc e meu pai Jesús Claros Muñoz, por sempre estarem comigo, que graças a seu exemplo eu tenho percorrido este caminho, são as pessoas que mais admiro e respeito, agradeço os por sempre me darem forças e me apoiarem em tudo. Às minhas irmãs, Catherine Claros Chacaltana e Angie Claros Chacaltana, companheiras e melhores amigas, que sempre estão comigo e são meu apoio. Ao meu amor, Edwin Gutierrez Rodriguez, o amor da minha vida, que nestes últimos anos é meu companheiro e amigo, ele também é parte de meu exemplo a seguir, sinto muito orgulho dele e agradeço por toda confiança, incentivo e amor que me brinda. As minhas melhores amigos, Andrea Villa Garcia, Shirley Guevara e Miguel Angel Flores que, além da distância, sempre me incentivaram a seguir para frente.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Laus, pela orientação, por ter me convidado a fazer parte da sua equipe no Serviço de Oftalmologia na qualidade de doutoranda na Unesp, pelos conhecimentos oferecidos, pela paciência e pelas oportunidade para meu crescimento profisional.

A Marcela Aldrovani, pela coorientação, pela paciência e por toda a ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colaboradores e também colegas e amigos do Serviço de Oftalmologia, tanto os presentes quanto os que por lá passaram.

A Karina Kamachi minha eterna dupla, amiga e companheira que foi de grande ajuda desde o início até o final da pesquisa. Ao Ivan Padua e a Gisele Valdetaro que desde o início também fizeram parte sempre me ajudando, sem se importar com horários. Ao Alexandre Barros Sobrinho e a Thais Abreu que me ajudaram na segunda fase do experimento. A Karina Herencia também por ser de grande ajuda nessa fase. Obrigada a todos pela ajuda e por fazerem parte deste trabalho, sem vocês não teria conseguido, este trabalho é fruto da dedicação de todos.

A Camila Balthazar, Roberta Renzo, Daniela de Souza, Gabriela Madruga, Roberta Crivelaro, Tiago Barbalho e Germana Alegro, pelo tempo partilhado, companherismo e amizade.

A toda a equipe da oftalmo, por todo o tempo, os risos, os bons e os maus momentos, porque, como time, sempre fomos capazes de resolver os imprevistos surgidos. Para mim é um orgulho ser parte de vocês. Muito obrigada por compartilharem esses quatro anos. Foi uma benção para mim e espero que o companherismo e a amizade sejam para sempre.

A todos os estagiários, funcionários do Hospital Veterinário e da Unesp, professores, residentes e pós graduandos, obrigada.

A Edwin Gutierrez por me ajudar a cuidar com muito carinho dos ratinhos.

A professora Kenia Bicego e ao professor Joaquim Mansano Garcia, por me permitirem usar o bioterio.

A Ophthalmos, por ceder os colírios para a pesquisa e à farmacêutica Ericka Costa Collares, pela ajuda quanto à manipulação dos fármacos.

A equipe do Biotério Central de Botucatu, pela ajuda e orientações.

A Carol Scarpellini, Vivian Biancardin e ao Sr. Euclides Roberto Secato, pelas orientações relativamente aos cuidados com os animais e por me auxiliarem quando precisei de animais.

À Professora Annelise Camplesi, a sua orientada Maria Lucia e a funcionária Lidiane pela ajuda ao me emprestarem materiais para o conforto dos animais.

Aos animais com os que compartilhei meses, enquanto não começava a pesquisa e no seu curso.

À CAPES pela bolsa de estudos durante meu doutorado e doutorado sanduiche (Proc. 88881.133761/2016-01).

À professora Bianca Da Costa Martins, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe de pesquisa e de poder conhecer pessoas maravilhosas que a compõem. À professora Kathryn Fleming e à toda equipe (Tatiane Villar, Sophie Rajotte, Rennie Putnam, Erotides Capistrano, Kelli Zimmerman Aislinn Klein, Lorri Zoch e Shari Poruba), pelos ensinamentos na “University of Illinois Urbana-Champaign”.

À ISVO e à Acrivet pela bolsa que me permitiu estagiar na “UC Davis”. Ao professor David Maggs, por ter me recebido durante esse estágio e pela oportunidade de viver a experiência junto à sua equipe. Aos professores Kathy Good, Steve Hollingsworth, Chris Murphy, Sara Thomasy, Mary Lassaline, Paul Russell, Roy Bellhorn, pelo aprendizado e tempo compartilhado, e a toda equipe na “ UC Davis” (Sydney Edwards, Bret Moore, Brian Leonard, Kelly Knickelbein e Ann Cooper), que me ajudaram e me ensinaram. À professora Melissa Bain e à sua familia por me receberem na sua casa e por me tratar como sendo parte da sua familia.

Ao CNPq (Proc. 300833/2010-5), FAPESP (Proc. 2009/51773-4) e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP pelo auxilio financeiro, indispensáveis para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor João Antonio Tadeu Pigatto e a toda a equipe da oftalmo (Mariana Tessarioli, Gustavo Brambati, Fabiana Quarteiro, Paula Hünning, Maria Cristina Andrade e Bernardo Bertch), em Porto Alegre, obrigada pelos ensinamentos e pela oportunidade de pertencer a essa extraordinária equipe, que fizeram parte do meu crescimento profissional.

A todos os amigos que fiz no meu caminho na pós-graducação, pelo carinho e tempo compartilhado, pelas maravilhosas experiências e novas familias que fiz em cada cidade onde morei, tanto em Porto Alegre (Claudia, Jhon, Omaira, Camila, João, Elvis, Jessica, Joaquin, Rubens, Frank, Raul, John, Jorge, Walter, Mauren, Veronica, etc.) durante o mestrado, assim como em Jaboticabal (Malu, Charles, Sylvia, Thais, Rosane, Carla, Giba, Joel, Leandra, Miguel, Angel, Helsi, David, Jefferson, Fernando, Maicon, Fernando, Fabio, etc.) e nos Estados Unidos (Pericles, Lamya, Nursel, Abel, Chekani, Agustian, Missael, Kinan, Akosua, Judy, Ella, Andrea, Yun, Brittany, Meera, Deby, Angie, Tiago, Kaaren Mendoza e sua familia, etc) durante o doutorado. Os meus amigos são como meus anjos que sempre estão comigo mesmo à distância. Obrigada, vocês fizeram com que eu me sentisse em casa, em cada lugar onde morei.

Muito Obrigada a Todos!

SUMÁRIO

Página

CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS iii
LISTA DE ABREVIATURAS iv
LISTA DE TABELAS v
LISTA DE FIGURAS vi
Resumo viii
ABSTRACT ix
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais..... 1
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1 Metronidazol 2
2.2 Angiogênese 4
2.3 Modelos Biológicos para Estudos sobre Angiogênese 6
2.4 Córnea 7
2.5 Avascularidade Corneal 8
2.6 Neovascularização Corneal 8
2.7 Angiogênese Corneal Experimental 10
3. HIPÓTESES 11
4. OBJETIVOS 11
3. REFERÊNCIAS 11
CAPÍTULO 2 – Corneal Angiogenesis Based on Different Protocols of Alkaline Cauterization in Murine Models 18
ABSTRACT 19
INTRODUCTION 20
METHODS 21
Animals and Procedures for Alkaline Cauterization 21
Evaluation of Corneal Vascularization Parameters 23
Statistical Analysis 23
Ethics 24

RESULTS ……..…….. 24
DISCUSSION ……...……..… 28
CONCLUSIONS …… 30
REFERENCES 30
CAPÍTULO 3 – Effect of Metronidazole Ophthalmic Solution on Corneal Neovascularization in Rats 34
ABSTRACT ……. 35
INTRODUCTION …… 36
MATERIAL AND METHODS ……... 37
Animals ……..……... 37
Corneal Alkali Burn Models and Treatment Groups ……..… 37
Clinical Examination of Chemically-Burned Corneas and Image Acquisition. 38
Burn intensity and neovascularization parameters ……...… 38
Histopathological Examination ……..... 39
Data Analysis……..……. 39
RESULTS ……... 40
DISCUSSION ……..... 48
ACKNOWLEDGEMENTS ……... 51
FUNDING 51
CONFLICT OF INTEREST 51
ETHICAL APPROVAL …….. 51
REFERENCES 52
CAPÍTULO 4 – Considerações Finais……..... 57

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 06174/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Metronidazol na angiogênese corneal em ratos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus, Wistar*)"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de maio de 2014.

Jaboticabal, 08 de maio de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância.
ARVO	*Association for Research in Vision and Ophthalmology*.
AVG rank	posição de um valor especificado em um conjunto de dados
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais.
CNV	corneal neovascularization
FGF	fator de crescimento de fibroblastos.
FGFb	fator de crescimento fibroblástico básico
G1	grupo 1
G2	grupo 2
G3	grupo 3
G4	grupo 4
GFs	fatores de crescimento.
KW	Kruskal–Wallis.
Max	valor máximo
Met_0.1%	grupo tratado com colírio de metronidazol 0,1%.
Met_0.5%	grupo tratado com colírio de metronidazol 0,5%.
Min	valor mínimo
PBS	tampão fosfato salino
PC	pontos que tocam as córneas
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PV	pontos que tocam os vasos.
SD	standard deviation
± sd	± standard deviation
Sham	grupo placebo, tratado com tampão fosfato salino.
Untreated	grupo não tratado.
VEGFA	fator de crescimento endotelial vascular A.
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular.
X	mediana

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Mean values with standard deviation, median, minimum, and maximum values, representing the burn intensity gradation in the G1, G2, G3, and G4 groups, on days 2, 4, 6, 8, 11, 13, and 15. Veterinary Ophthalmology Service, Unesp/FCAV, Jaboticabal, SP, Brazil, 2017…….. 25

Tabela 2 Mean values with standard deviation, median, minimum, and maximum values, representing the burn intensity gradation in the G1, G2, G3, and G4 groups, on days 2, 4, 6, 8, 11, 13, and 15. Veterinary Ophthalmology Service, Unesp/FCAV, Jaboticabal, SP, Brazil, 2017…….. 27

Tabela 3 Mean values with standard deviations, representing the corneal neovascularization profiles in the G1, G2, G3, and G4 groups, on days 2, 4, 6, 8, 11, 13 and 15. Veterinary Ophthalmology Service, Unesp/FCAV, Jaboticabal, SP, Brazil, 2017……. 27

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Burn intensity scores for the study groups…… 42

Tabela 2 Indices of corneal neovascularization obtained for the study groups……..… 44

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Figura 1 Estrutura química do metronidazol. *National Institutes of Health, Health & Human Services*…….. 2

Figura 2 Angiogênese fisiológica e angiogênese patológica. (a), sob condições fisiológicas adequadas, alguns estímulos, como a hipóxia, podem ativar a cascata angiogênica. Na fase de iniciação, fatores de crescimento (GFs), como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), ensejam aumento das células endoteliais e desestabilização do vaso sanguíneo, o que inicia a germinação de um novo vaso e a proliferação endotelial vascular. No estabelecimento e perfusão do novo vaso, os níveis de VEGF diminuem e a fase de resolução resulta coincidente com um aumento no fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), entre outros. (b), sob condições patológicas, como na neovascularização tumoral impulsionada por oncogenes, o VEGFA secretado pelo tumor pode ativar a cascata angiogênica. O oncogene MYC, por exemplo, expresso em células tumorais, eleva a expressão de fatores solúveis envolvidos na ativação de fibroblastos residentes e responsáveis por atrairem células do sistema imunológico para o sítio angiogênico (Modificado de CHUNG; LEE; FERRARA, 2010)..... 5

CAPÍTULO 2

Figura 1 A, images of corneas with vessels, using a green filter (red free) in the G1, G2, G3, and G4 groups, on day 15 of the evaluation. B, comparison between the percentages of the corneal area containing vessels in the G1, G2, G3, and G4 groups, on day 15 of the evaluation. *P < 0.05; G1 versus G3 and G4. Veterinary Ophthalmology Service, Unesp/FCAV, Jaboticabal, SP, Brazil, 2017…….....……. 26

Figura 2 Images of corneas with burn intensity secondary to the corneal lesion induced by alkali (arrows). Grade 0 (A), 1 (B), 2 (C), and 3 (D). Veterinary Ophthalmology Service, Unesp/FCAV, Jaboticabal, SP, Brazil, 2017…….. 26

CAPÍTULO 3

Figura 1 Flowchart of the treatment groups compared in the study, and simplified experimental design……. 38

Figura 2 Representative images of corneas that according to the intensity of the burn, i.e., the appearance of blisters and their elevation from the ocular surface, were scored as 0 (no blister, no raised above corneal surface) (A), 1 (a small blister that is slightly raised above the surface) (B), 2 (a medium blister that is moderately raised above the surface) (C), and 3 (a large blister) (D)…….…….. 40

Figura 3 Extension of CNV. (A) corresponds to a panel containing representative images of CNV observed in each study group. Visual inspection of these images shows that corneas in the Met_0.1% and Met_0.5% groups have fewer vascularized areas compared to the corneas in the untreated and Sham groups. (B) corresponds to a line chart showing the differences in percentage of vascularized corneal area between the study groups. (C–I) correspond to boxplot charts showing the extent of vascularized corneal area in each study group at days 7, 12, 15, 18, 21, 26, and 30. Different letters represent the statistical differences (P < 0.05, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test)…… 45

Figura 4 Histopathological examination of vascularized corneas. (A and B) correspond to combined boxplot and bar charts (of median values, with interquartile range error bars) showing the numbers of vessels counted in corneas from each study group on days 15 and 30 of examination. Note that corneas in the Met_0.1% and Met_0.5% groups showed fewer vessels than corneas in the untreated and Sham groups. Different letters represent the statistical differences (P < 0.05, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test). (C) corresponds to the photomicrography of a cornea that according to the vascularization was histologically scored as 1. The arrow heads indicate the vessels. (D) corresponds to a cornea scored as 2. The arrow heads indicate the vessels. (E) corresponds to a cornea scored as 3. The arrow heads indicate the vessels, the black arrow points to an inflammatory cell, and the asterisk indicates a focus of fibroblastic activity. (F) corresponds to a cornea scored as 4. The arrow heads indicate the vessels. Note that the corneal epithelium is thickened. Bars = 20 micrometers. (G and H) correspond to the stacked bar graphs showing percentages of corneas scored as 1, 2, 3, and 4 for each study group on days 15 and 30 of examination…… 47

METRONIDAZOL NA ANGIOGÊNESE CORNEAL EM RATOS
(*Rattus norvegicus*, variação *albinus, Wistar*)

RESUMO – Visou-se avaliar os efeitos do metronidazol sobre a neovascularização corneal. A pesquisa foi dividida em dois artigos. No primeiro, compararam-se modelos de angiogênese corneal induzida por cauterização alcalina. Vinte e quatro ratos *Wistar* foram distribuídos em quatro grupos, que diferiram apenas quanto aos procedimentos para cauterização alcalina. Um fragmento circular de papel filtro de 3mm, embebido em solução aquosa de nitratos de prata e de potássio (3:1, vol/vol), foi pressionado sobre a região axial da córnea (olho direito). Os tempos de contato do papel com a córnea foram de 10 segundos para os grupos 1 e 4 (G1 e G4) e de 20 segundos para os grupos 2 e 3 (G2 e G3). Após cauterização, as córneas foram lavadas, por 1 min. Em G1 e em G2 os papéis filtro foram removidos imediatamente antes da lavagem. Em G3 e em G4, as córneas foram lavadas com os papeis filtro *in loco*. Parâmetros de neovascularização corneal foram estudados em diferentes momentos pós-cauterização. Diferenças foram significativas quando $p < 0,05$. As córneas em G1 apresentaram menos áreas vascularizadas (12,63 ± 12,59%), em comparação às córneas em G3 (41,95 ± 17,32%) e ém G4 (33 ± 11,74%) ($p < 0,05$). Os protocolos adotados para G2, G3 e G4 mostraram excelente reprodutibilidade, com 100% de córneas vascularizadas. No segundo, objetivou-se monitorar efeitos de instilações de soluções oftálmicas de metronidazol, 0,1% e 0,5%, sobre a neovascularização corneal, induziram-se lesões por cauterização alcalina em córneas (olho direito) de 40 ratos *Wistar* como descrito para G3. Após cauterização, os ratos foram distribuídos em quatro grupos (Met_0.1%, Met_0.5%, Sham, e não tratado). Os grupos Met_0.1% e Met_0.5% receberam, por instilação, soluções de metronidazol ao 0,1% ou de 0,5%, respectivamente, à intervalos de 6 horas, por 30 dias. O grupo Sham recebeu tampão fosfato salino (diluente de metronidazol). O grupo não tratado não recebeu qualquer instilação. Córneas em todos os grupos foram avaliadas em diferentes momentos pós-cauterização, quanto às intensidades das queimaduras, aos índices de neovascularização e aos percentuais de áreas vascularizadas. Nos dias 15 e 30, cinco ratos de cada grupo foram submetidos à eutanásia, para colheita de córneas que foram avaliadas à histopatologia. Diferenças foram significativas quando $p < 0,05$. Os índices de neovascularização corneal calculados para os grupos Met_0.1% e Met_0.5% foram menores que os obtidos para os grupos Sham e não tratado ($p < 0.05$). Córneas tratadas com 0,1% ou 0,5% de metronidazol apresentaram menos áreas vascularizadas. Há como admitir que a instilação de soluções de metronidazol, 0,1% ou 0,5%, inibiu o crescimento de vasos e a progressão de neovascularização corneal, em ratos albinos de laboratório.
Palavras-chave: cauterização alcalina, neovascularização corneal, metronidazol, rato

METRONIDAZOLE IN CORNEAL ANGIOGENESIS IN RATS
(*Rattus norvegicus*, Albinus variation, *Wistar*)

ABSTRACT- The effect of metronidazole on corneal neovascularization were evaluated. The research was divided into two articles. In the first, models of corneal angiogenesis by alkaline cauterization were developed. Twenty-Four Wistar rats were divided into four groups, which differed in procedures for alkaline cauterization. A circular piece of filter paper of 3mm, soaked in a solution of silver and potassium nitrates (3:1, vol/vol) was pressed onto the axial region of the cornea (right eye). Cauterization times were 10 (G1 and G4), or 20 seconds (G2 and G3). After cauterization, the corneas were washed or 1 min. In G1 and G2, the filter papers were removed just prior to washing. In G3 and G4, the corneas were washed with the filter paper in loco. The parameters of corneal neovascularization were studied at different moments of after cauterization. Differences with $p < 0.05$ were considered significant. On day 15, G1 corneas showed smaller vascularized areas (12.63 ± 12.59%) compared to those in the G3 (41.95 ± 17.32%) and G4 (33 ± 11.74%) groups ($p < 0.05$). The G2, G3, and G4 protocols showed excellent reproducibility, and induced vascularization in 100% of corneas. In the second, in order to monitor the effects of 0.1% and 0.5% instillations of metronidazole ophthalmic solutions on corneal neovascularization. After cauterization, rats were distributed in four groups (Met_0.1%, Met_0.5%, Sham, and untreated). The groups Met_0.1% and Met_0.5% received, by instillation, solutions of 0.1% and 0.5% metronidazole solution, respectively, at intervals of 6 hours, for 30 days. The Sham group received phosphate-buffered saline (metronidazole diluent). Untreated group received no treatment or instillation. The corneas in all groups were evaluated at different post-cauterization moments, regarding burn intensitiy, indices of CNV and percentages of vascularized areas. On days 15 e 30 after the burn, five rats from each group were euthanized for the harvest of corneas which were processed for histopathological examinations. Differences with $p < 0.05$ were considered significant. However, the indices of corneal neovascularization (CNV) for Met_0.1% and Met_0.5% groups were lower than those for Sham and untreated groups ($p < 0.05$). Furthermore, corneas treated with 0.1% or 0.5% metronidazole have fewer vascularized areas compared to control corneas. We can admit that regular instillation of 0.1% or 0.5% metronidazole inhibits blood vessel growth and progression of neovascularization in alkali-burned corneas of laboratory albino rats.

Key words: alkaline cauterization, corneal neovascularization, metronidazole, rat

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1 INTRODUÇÃO

A neovascularização corneal é condição patológica que ocorre em resposta a injúrias, como as infecciosas e as inflamatórias. Caracteriza-se pela gênese e o crescimento de vasos sanguíneos na córnea. Quando não controlada, a neovascularização corneal ocasiona déficil visual importante.

Relativamente aos mecanismos de neovascularização corneal, grande parte do conhecimento advém de estudos envolvendo modelos experimentais de angiogênese patológica induzida. Há, em literatura, diferentes protocolos para indução de lesões corneais que culminam em neovascularização. O mais difundido deles é o de cauterização alcalina pontual. No entanto, a cauterização alcalina pontual está associada com padrões variáveis de resposta vascular, a depender de variantes metodológicas, que incluem o formato do instrumento cauterizante e o tempo de exposição da córnea a ele. Para assegurar homogeneidade e evitar *viéses* em estudos comparativos sobre neovascularização corneal, notadamente nos que envolvem fármacos ou procedimentos cirúrgicos em teste, recomenda-se que o modelo experimental seja validado.

As diferentes modalidades farmacológicas e cirúrgicas, atualmente disponíveis para tratamento da neovascularização corneal, não são totalmente efetivas e estão associadas com índices variáveis de sucesso clínico. Relativamente ao uso de fármacos, congregam-se, entre outros, os agentes anti-inflamatórios e os biofárrmacos. Enquanto os anti-inflamatórios estão associados com efeitos adversos, os biofármacos são de uso *off label*. Há, por conseguinte, a necessidade científica e econômica pela descoberta de novos fármacos, capazes de modularem vias anti-angiogênicas em córneas neovascularizadas.

O metronidazol pertence à classe dos nitroimidazóis e é empregado, inclusive em oftalmologia, no tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbias e por protozoários. Há evidências de que ele pode modular a angiogênese patológica. Todavia, estudos prévios conduzidos em tecidos não oculares resultaram em achados controversos. Os efeitos de colírios de metronidazol sobre a neovascularização

corneal não são conhecidos, porém, podem ser investigados em modelos experimentais de angiogênese.

No presente estudo, avaliaram-se padrões de resposta vascular decorrentes de diferentes procedimentos para cauterização alcalina em córneas de ratos. Ademais, monitoraram-se efeitos de instilações regulares de colírios de metronidazol, 0,1% e 0,5%, sobre a gênese e o crescimento de vasos em modelos experimentais de angiogênese corneal.

5. REFERÊNCIAS[1]

AKAR, E. E.; ÖNER, V.; KÜÇÜKERDÖNMEZ, C.; AKOVA, Y. A. Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of

[1]Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002. 23p.

corneal neovascularization in a rat model. **International Journal of Ophthalmology**, Beijing, v. 6, n. 2, p. 136, 2013.

AMBATI, B. K.; NOZAKI, M.; SINGH, N. TAKEDA, A.; JANI, P. D.; SUTHAR, T.; ALBUQUERQUE, R. J. C.; RICHTER, E.; SAKURAI E.; NEWCOMB, M. T.; KLEINMAN, M. E.; CALDWELL, R. B.; QING, L.; OGURA, Y.; ORECCHIA, A.; SAMUELSON D. A.; AGNEW, D. W.; LEGER, J. St.; GREEN, W. R.; MAHASRESHTI, P. J.; CURIEL, David T. ; KWAN, D.; MARSH, H.; IKEDA, S.; LEIPER, L. J. ; COLLINSON, J. M.; BOGDANOVICH, S.; KHURANA, T. S.; SHIBUYA, M.; BALDWIN, M. E.; FERRARA, N.; GERBER, H.; DE FALCO, S.; WITTA, J.; BAFFI, J. Z.; RAISLER, B. J.; AMBATI, J. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. **Nature,** London, v. 443, n. 7114, p. 993-997, 2006.

AMPARO, F.; SADRAI, Z.; JIN, Y.; ALFONSO-BARTOLOZZI, B.; WANG, H.; SHIKARI, H.; CIOLINO, J. B.; CHODOSH, J.; JURKUNAS, U.; SCHAUMBERG, D. A.; DANA, R. Safety and Efficacy of the Multitargeted Receptor Kinase Inhibitor Pazopanib in the Treatment of Corneal Neovascularization. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** St. Louis, v. 54, n. 1, p. 537-544, 2013.

AUSPRUNK, D.H.; FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvascular Research,** New York, v. 14, n. 1, p. 53-65, 1977.

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

BARROS, L. F. M.; BELFORT, R. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin®) on angiogenesis in the rat cornea. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.79, p. 389-394, 2007.

BOCK, F.; ONDERKA, J.; DIETRICH, T.; BACHMANN, B.; KRUSE, F. E.; PASCHKE, M.; FRIEDRICH, E. K.; CURSIEFEN, C Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** St. Louis, v. 48, n. 6, p. 2545-2552, 2007.

BROWN, M. D.; HUDLICKA, O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. **Angiogenesis,** London, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2003.

CHANG, J. H.; GABISON, E. E.; KATO, T.; AZAR, D. T. Corneal neovascularization. **Current Opinion in Ophthalmology,** Philadelphia, v. 12, n;.4, p. 242-249, 2001.

CHAPLIN, S. Topical antibacterial and antiviral agents: prescribing and resistance. **Prescriber,** v. 27, n. 7, p. 29-36, 2016.

CHO, W. G.; ALBUQUERQUE, R. J.; KLEINMAN, M. E.; TALLARO, V.; GRECO, A.; NOZAKI, M.; GREEN, M. G.; BAFFI, J. Z.; AMBATI, B. K.; DE FALCO, M.; ALEXANDER, J. S.; BRUNETTI, A.; DE FALCO, S.; AMBATI, J. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington, v. 106, n. 17, p. 7137-7142, 2009.

CHUNG, A. S.; FERRARA, N. Developmental and pathological angiogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology,** Palo Alto, v. 27, p. 563-584, 2011.

COCKERILL, G. W.; GAMBLE, J. R.; VADAS, M. A. Angiogenesis: models and modulators. **International Review of Cytology,** Knoxville, v. 159, p. 113-160, 1995.

CURSIEFEN, Claus. **Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea.** En Immune Response and the Eye. Karger Publishers, 2007. p. 50-57.

DA COSTA SANTOS, C. M.; DE MATTOS PIMENTA, C. A.; NOBRE, M. R. C. A systematic review of topical treatments to control the odor of malignant fungating wounds. **Journal of Pain and Symptom Management,** New York, v. 39, n. 6, p. 1065-1076, 2010.

DASTJERDI, M. H.; AL-ARFAJ, K. M.; NALLASAMY, N.; HAMRAH, P.; JURKUNAS, U. V.; PINEDA, R.; PAVAN-LANGSTON, D.; DANA, R. Topical Bevacizumab in the Treatment of Corneal Neovascularization. Results of a Prospective, Open-Label, Noncomparative Study. **Archives of Ophthalmology,** Chicago, v. 127, n. 4, p. 381-389, 2009.

DE CASTRO, D. L. V.; DE GOUVEIA SANTOS, V. L. C. Controle do odor de feridas com metronidazol: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP,** São Paulo, v. 49, n. 5, p. 858-863, 2015.

ELLENBERG, D.; AZAR, D. T.; HALLAK, J. A.; TOBAIGY, F.; HAN, K. Y.; JAIN, S.; ZHOU, Z.; CHANG, J. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. **Progress in Retinal and Eye Research,** Oxford, n. 29, p. 208-248, 2010.

GIACOMINI, C.; FERRARI, G.; BIGNAMI, F.; RAMA, P. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal neovascularization. **Experimental Eye Research,** London, v. 121, p. 1-4, 2014.

GONÇALVES, M. G.; HEINECK, I. Frequência de prescrições de medicamentos off label e não licenciados para pediatria na atenção primária à saúde em município do sul do Brasil. **Revista Paulista de Pediatria,** São Paulo, v. 34, n. 1, p. 11-17, 2016.

HABOT-WILNER, Z.; BAREQUET, I. S.; IVANIR, Y.; MOISSEIEV, J. ROSNER, M. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. **Acta ophthalmologica,** Oxford, v. 88, n. 8, p. 862-867, 2010.

HOSSEINI, H.; NEJABAT, M.; MEHRYAR, M.; YAZDCHI, T.; SEDAGHAT, A.; NOORI, F. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. **Clinical and Experimental Ophthalmology,** New Zealand, v. 35, p. 745–748, 2007.

JETTEN, N.; VERBRUGGEN, S.; GIJBELS, M. J.; POST, M. J.; DE WINTHER, M. P.; DONNERS, M. M. P. C. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis,** London, v. 17, n. 1, p. 109-118, 2014.

KANG, S.; CHUNG, S. K. The Effect of Subconjuctival Combined Treatment of Bevacizumab and Triamcinolone Acetonide on Corneal Neovascularization in Rabbits. **Cornea,** Fairfax, v. 29, n. 2, p. 192-196, 2010.

KENYON, B. M.; VOEST, E. E.; CHEN, C. C.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J.; D´AMATO, R. J. A model of angiogenesis in the mouse cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** St. Louis, v. 37, n. 8, p. 1625-1632, 1996.

KIM, S. W.; HA, B. J.; KIM, E. K.; TCHAH, H.; KIM, T. The effect of topical Bevacizumab on Corneal Neovascularization. **Ophthalmology,** New York, v. 115, n. 6, p. e33-e38, 2008.

KODYM, A.; KACZY—SKA-DYBA, E.; KUBIAK, B.; KUKULA, H. Technology of Eye Drops Containing Metronidazole. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Bydgoszcz, v. 68, n. 1 p. 109-114, 2011.

KWON, Y. S.; HONG, H. S.; KIM, J. C.; SHIN, J. S.; SON, Y. Inhibitory Effect of Rapamycin on Corneal Neovascularization In Vitro and In Vivo. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** St. Louis, v. 46, n. 2, p. 454-460, 2005.

LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. **Clinical Infectious Diseases**, Tehran, v. 50, n. 1, p. S16-S23, 2010.

MCCLELLAN, K. J.; NOBLE, S. Topical metronidazole. **American Journal of Clinical Dermatology,** Auckland, v. 1, n. 3, p. 191-199, 2000.

MICHALSKA, M.; PALATYŃSKA-ULATOWSKA, A.; PALATYŃSKI, A.; MIROWSKI, M.; KAPLIŃSKA, K.; NAWROT-MODRANKA, J.; LAZARENKOW, A. Influence of antibiotic therapy on the level of selected angiogenic factors in patients with benign gynecologic tumors - preliminary report. **Pharmazie,** Pomorska, v. 66, n. 8, p. 619-622, 2011.

NG, E. W. M.; ADAMIS A. P. Anti-VEGF Aptamer (Pegaptanib) Therapy for Ocular Vascular Diseases. **Annals New York Academy of Sciences,** New York, n. 1082, p. 151-171, 2006.

NISHIMUTA, K.; ITO, Y. Effects of metronidazole and tinidazole ointments on models for inflammatory dermatitis in mice. **Archives of Sermatological Research,** Berlin, v. 294, n. 12, p. 544-551, 2003.

NICHOLSON, T. J.; ARMSTRONG, D. Topical metronidazole (10 percent) decreases posthemorrhoidectomy pain and improves healing. **Diseases of the Colon & Rectum,** Louisville, v. 47, n. 5, p. 711-718, 2004.

NORRBY, K. In vivo models of angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** Hoboken, v. 10, n. 3, p. 588-612, 2006.

OLIVEIRA, L. B. O.; GOMES, C. F.; RHEINGANTZ, M. G.; SOUZA, M. A. L. Angiogênese e Tumorigênese: Onde Ocorre a Intersecção e as Possibilidades de Terapias. **VITTALLE,** Rio Grande, v. 22, n. 2, p. 11-22, 2010.

PAPATHANASSIOU, M.; THEODOSSIADIS, P. G.; LIARAKOS, V. S.; ROUVAS, A.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; VERGADOS, I. A. Inhibition of corneal Neovascularization by Subconjunctival Bevacizumab in an Animal model. **American Journal of Ophthalmology**, Miami, v. 145, n. 3, p. 424-431, 2008.

PÉREZ-SANTONJA, J. J.; CAMPOS-MOLLO, E.; LLEDÓ-RIQUELME, M.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L.; CUENCA-NAVARRO, N. Cambios en la morfología y la microdensidad neovascular corneal inducidos tras la administración tópica de bevacizumab y sunitinib en un modelo animal. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología,** Madrid, v. 88, n. 12, p. 473-481, 2013.

PÉREZ-TRALLERO, E.; IGLESIAS, L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica,** Barcelona, v. 21, n. 9, p. 520-9, 2003.

PEZO, C. Efecto angiogénico de Metronidazol y Alfa Bisabolol en membrana alantocoriónica de pollo, un modelo in vivo en angiogénesis experimental. **Bio noticias,** Santiago de Chile, n. 1, p. 63-64, 2012.

PISO, D. Y. T.; RIBEIRO, A. P.; SILVA, M. L.; GUIMARÃES, P. J.; MORALES, A.; MARTINS, B. C.; PADUA, I. M.; RENZO, R.; ANDRADE, A. L.; USCÁTEGUI, R. R.; LAUS, J. L. Effects of antiproteolytic agents on corneal epithelial viability and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activity in alkali-burned corneas of rats. **Veterinary ophthalmology,** Baltimore, v. 17, n. 1, p. 23-31, 2014.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine,** Michigan, v. 6, n. 3, p. 230-247, 1995.

QIAN, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; ZHAO, J.; ZHU, H. Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of cinnamic acid metronidazole ester derivatives as novel anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** Dortmund, n. 18, p. 4991-4996, 2010.

RAO.C.M.; GHOSH, A.; RAGHOTHAMA, C.; BAIRY, K. L. Does metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing? **Burns,** Dallas, v. 28, n. 5, p. 427-429, 2002.

ROGERS, M. S.; BIRSNER, A. E.; D´AMATO, R. J. The mouse cornea micropocket angiogenesis assay. **Nature protocols,** London, v. 2, n. 10, p. 2545-2550, 2007.

SAFATLE, A. M. V.; BARROS, P. S. M.; MALUCELLI, B. E.; GUERRA, J. L. Implantation of two biological membranes in a corneal micropocket as an experimental model for angiogenesis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** São Paulo, v. 39, n. 4, p. 189-195, 2002.

SAMOLOV, B.; STEEN, B.; SEREGARD, S.; VAN DER PLOEG, I.; MONTAN, P.; KVANTA, A. Delayed inflammation-associated corneal neovascularization in MMP-2-deficient mice. **Experimental Eye Research**, London v. 80, n. 2, p. 159-166, 2005.

SAMPAIO, C. P. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; TRINDADE, L. C. T.; FARIAS, R. E.; PIERIN, R. J.; MARTINS, R. C. Alterações inflamatórias provocadas pelo metronidazol em feridas: estudo experimental em ratos. **Journal Vascular Brasileiro,** São Paulo, n. 8, v. 3, p. 232-237, 2009.

SENTURK, B.; CUBUK, M. O.; OZMEN, M. C.; AYDIN, B.; GULER, M. O.; & TEKINAY, A. B. Inhibition of VEGF mediated corneal neovascularization by anti-angiogenic peptide nanofibers. **Biomaterials,** New York, v. 107, p. 124-132, 2016.

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

TEIXEIRA, A. L.; BARROS, L. F. M.; BARROS, P. S. M. Afecções da Túnica Vascular. In: LAUS, J. L. **Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães e em Gatos**. cap. 5, 1ª ed., ed. Roca, São Paulo, 2009.

VAN DER BIJL, P.; VAN EYK, A. D.; SEIFART, H. I.; MEYER, D. In Vitro Transcorneal Penetration of Metronidazole and Its Potential Use as Adjunct Therapy in Acanthamoeba Keratitis. **Cornea,** Fairfax, v. 23, p. 386–389, 2004.

WHITLEY, R. D.; GILGER, B. C. Diseases of the canine cornea and sclera**.** In: GELATT, K. N. (Ed). **Veterinary ophthalmology.** Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 635-662.

YPSILANTIS, E.; CARAPETI, E.; CHAN, S. The use of topical 10 % metronidazole in the treatment of non-healing pilonidal sinus wounds after surgery. **International Journal of Colorectal Disease,** Heidelberg, v. 3, n. 31, p. 765-767. 2015.

CAPÍTULO 4 – Considerações Finais

Os resultados no Capítulo 2 deste estudo, referentes ao artigo “Corneal angiogenesis based on diferente protocols of alcaline cauterization in murine models”, mostraram que variações nos procedimentos para cauterização alcalina pontual ensejam diferentes padrões de resposta vascular, ou seja, diferentes perfis de crescimento e de invasão de vasos na córnea. Nem sempre, neste estudo, observaram-se padrões homogêneos de resposta vascular, o que, em estudos comparativos, poderia resultar em *viéses* e comprometer a reprodutibilidade dos resultados. Ademais, um de quatro protocolos de cauterização aqui avaliados, um não apresentou boa repetibilidade intralaboratorial. Melhores resultados e alta repetibilidade, em termos de homogeneidade de resposta vascular, foram conseguidos por meio de protocolo no qual um papel filtro, com 3 mm em diâmetro, saturado em solução de nitrato de prata e de potássio 3:1, vol/vol, foi gentilmente pressionado sobre a região axial da córnea, por 20 sec. Ato contínuo, o papel filtro foi removido e a córnea foi lavada por 1 min com solução de Ringer lactato.

Os resultados no Capítulo 3 deste estudo, referentes ao artigo “Effect of Metronidazole ophthalmic solution on corneal neovascularization in rats”, mostraram que a instilação regular (a cada seis horas) de colírios de metronidazol, 0,1% ou 0,5%, por 30 dias, inibiu o crescimento de vasos e promoveu regressão de neovascularização corneal induzida por cauterização alcalina, em ratos.