UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOMARCAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL E DA METALOPROTEINASE-9 EM ÚLCERAS CORNEAIS QUÍMICAS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* - Linnaeus, 1758), TRATADAS COM CETOROLACO DE TROMETAMINA

Tiago Barbalho Lima

Médico Veterinário

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOMARCAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL E DA METALOPROTEINASE-9 EM ÚLCERAS CORNEAIS QUÍMICAS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* - Linnaeus, 1758), TRATADAS COM CETOROLACO DE TROMETAMINA

Tiago Barbalho Lima
Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Pinto Ribeiro

Dissertação de Mestrado 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.

2013

Lima, Tiago Barbalho
L732i Imunomarcação da óxido nítrico sintase induzível e da metaloproteinase-9 em úlceras corneais químicas de coelhos (*oryctolagus cuniculus* - Linnaeus, 1758), tratadas com cetorolaco de trometamina / Tiago Barbalho Lima. – – Jaboticabal, 2013
xii, 50 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: José Luiz Laus
Banca examinadora: Cristiane dos Santos Honsho, Ana Lúcia Abreu Silva
Bibliografia

1. Coelho. 2. Córneas. 3. Cetorolaco de trometamina. 4. iNOS. 5. MMP-9. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617.7:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: barbalho.tiago@gmail.com

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IMUNOMARCAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL E DA METALOPROTEINASE-9 EM ÚLCERAS CORNEAIS QUÍMICAS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* - LINNAEUS, 1758), TRATADAS COM CETOROLACO DE TROMETAMINA

AUTOR: TIAGO BARBALHO LIMA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE LUIZ LAUS

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ALEXANDRE PINTO RIBEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIRURGIA VETERINÁRIA , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSE LUIZ LAUS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. CRISTIANE DOS SANTOS HONSHO
Universidade de Franca / Franca/SP

Profa. Dra. ANA LÚCIA ABREU SILVA
Universidade Estadual do Maranhão / São Luis/MA

Data da realização: 28 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TIAGO BARBALHO LIMA – Nascido em primeiro de junho de 1985. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Maranhão em julho de 2008. Durante o período da graduação foi bolsista do Programa de Iniciação Científica do CNPq durante 3 anos (2004, 2005 e 2006). Foi bolsista do programa de monitoria em Técnica Cirúrgia em 2007. Foi residente de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais pelo Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública da Universidade Estadual Paulista – Câmpus Jaboticabal nos anos de 2009 e 2010. Ingressou no curso de Mestrado, no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP em 2011.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor, se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcuta

DEDICO,

Aos meus pais, José Humberto e Maria da Conceição, seu amor e dedicação incondicionais me fazem forte e perseverante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as coisas boas que tenho vivido e por proporcionar cada conquista na minha vida.

Ao meu orientador, José Luiz Laus, pela oportunidade. Admiro-o por sua sabedoria e orientação. Aprendo a cada atitude, aula, crítica, a cada palavra.

Ao meu co-orientador, Alexandre Pinto Ribeiro, pela idealização deste projeto. Para mim, um exemplo de pesquisador e amigo, no qual me espelho sempre.

Ao Luciano Fernandes da Conceição e toda equipe, que iniciaram este trabalho e permitiram que eu pudesse continuá-lo.

Ao Marcio Bandarra e à Prof. Rosemari de Oliveira Vasconcelos, pela realização da imunoistoquímica, assim como todos do laboratório, que de alguma forma contribuíram.

Ao mais novo amigo Wilson Gómez Manrique, pela parceria nesta etapa final, você foi fundamental e jamais esquecerei da sua ajuda!

Aos técnicos, Orandi Mateus e Maria Inês Yamazaki de Campos pela confecção das lâminas, sempre que foi necessário.

Aos companheiros do Serviço de Oftalmologia, Alexandre (Antônio) Augusto Franchi de Barros Sobrinho, Camila Pinho Baltazar da Silveira (Bya), Fabio Andrade Marinho, Germana Alegro da Silva, Ivan Ricardo Martinez Pádua, Kethye Priscila Ortencio, Luciana Cenço Correa de Lacerda, Luciano Fernandes da Conceição, Roberta Martins Crivelaro (Ti-ti-ti), Roberta Renzo, Séfora Vieira da Silva Gouvea de Barros e Karina Kamachi Kobachigawa (Tcháina) pelo apoio e convívio. Me orgulho em fazer parte deste grupo.

Aos meus pais, José Humberto Silva Lima e Maria da Conceição Barbalho Lima; irmãos, Larissa Barbalho Lima, Vinícius Barbalho Lima e a toda a família, apoio e base para tudo que conquistei. A saudade só aumenta. Serei eternamente grato!

Aos amigos da República , Diogo Soares, Paulo Vinícius Tertuliano Marinho e Thiago Francisco Ventoso Bompadre (Justin), pela convivência e momentos de descontração, tão importantes nessa jornada.

A Carol Godoi Aoki, por tantas vezes ter ouvido meus problemas, pela parceria e paciência. Não poderia esquecer você.

Aos animais, que sem pedir, nos ensinaram tanto e são os melhores e maiores motivos de eu estar aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio à pesquisa. Processos 2011/03681-3; 2011/07848-0;

À Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – FCAV Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização deste curso;

A todas as pessoas, que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

A todos muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	01
2. OBJETIVOS.....	06
2.1 Objetivo geral.....	06
2.2 Objetivos específicos.....	06
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	06
3.1 Animais.....	06
3.2 Procedimentos	07
3.3 Tratamento e colheita das córneas.....	08
3.4 Avaliação clínica.....	09
3.5 Histologia.....	09
3.6 Imunoistoquímica.....	10
3.7 Estatística.....	11
4 RESULTADOS.....	12
4.1 Avaliação clínica.....	12
4.1 Histologia.....	15
4.1 Imunoistoquímica.....	19
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

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 007616/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Efeitos do cetorolaco de trometamina sobre a expressão da oxido nítrico sintase e da metaloproteinase-9, na córnea de coelhos ulceradas com hidróxido de sódio**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de Maio de 2011.

Jaboticabal, 13 de Maio de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

IMUNOMARCAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL E DA METALOPROTEINASE-9 EM ÚLCERAS CORNEAIS QUÍMICAS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* - Linnaeus, 1758), TRATADAS COM CETOROLACO DE TROMETAMINA

RESUMO - Estudaram-se os efeitos do cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, quanto ao tempo de epitelização, a alterações clínicas, histológicas (HE), sobre expressão da Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) e da Metaloproteinase-9 (MMP-9) na ceratite ulcerativa causada por álcali em coelho. Doze olhos foram tratados (GT) com o fármaco e outros 12 com solução salina (GC), imediatamente à ocorrência das úlceras e a cada 6 horas. Decorridas 24h, seis córneas (n=6) de cada grupo foram colhidas (primeiro momento). As demais (n=6), o foram após a reepitelização (segundo momento). Em ambos os momentos, avaliaram-se o infiltrado inflamatório e as condições do epitélio neoformado (HE). Por imunoistoquímica, a imunomarcação de iNOS e de MMP-9 foi avaliada. A média do tempo de epitelização no GT foi de 55 horas. No GC, ele foi de 44 horas ($p<0,05$). Às 24 h, as córneas do GT apresentaram menor exsudação inflamatória ($p<0,01$), comparativamente ao GC. No segundo momento, o GT mostrou discreta exsudação inflamatória ($p>0,05$) e camada epitelial simples. O GC mostrou maior estratificação no epitélio neoformado. A média de imunomarcação de iNOS em células do estroma foi maior em GT, no primeiro e segundo momentos, comparativamente a GC ($p>0.05$). No segundo momento, a região central expressou mais iNOS, comparativamente à periférica, tanto em GT ($p<0,01$), quanto em GC ($p<0,05$). No epitélio, não se observaram diferenças significativas dos escores de imunomarcação de iNOS entre os grupos e os momentos ($p=0.69$). Os escores de imunomarcação para MMP-9, no epitélio, foram menores em GT, comparativamente a GC ($p=0,69$). A média de imunomarcação de MMP-9 em células do estroma, no segundo momento, foi maior na região central, comparativamente à periférica ($p=0.32$). Não houve correlação entre a imunomarcação de iNOS e MMP-9, assim como o quantitativo de células inflamatórias e a imunomarcação de iNOS. A partir dos resultados, é possível admitir que o cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, induziu a uma menor exsudação inflamatória, e a alterações não significativas na expressão de iNOS e MMP-9, retardando a epitelização corneal.

Palavras chave: coelho, córneas, cetorolaco de trometamina, iNOS e MMP-9

IMUNOSTAINING OF THE INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE AND METALLOPROTEINASE-9 IN CHEMICAL CORNEAL ULCERS OF RABBITS (Oryctolagus cuniculus - Linnaeus, 1758), TREATED WITH KETOROLAC TROMETHAMINE

ABSTRACT - We studied the effects of ketorolac tromethamine at 0.5% without preservative, about the time of epithelialization, the clinical, histological (HE) on the expression of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and metalloproteinase-9 (MMP -9) in ulcerative keratitis in rabbits caused by alkali. Twelve eyes were treated (GT) to the drug and 12 with saline (GC), immediately to the occurrence of ulcers and every 6 hours. After 24h, six corneas (n = 6) of each group were harvested (first moment). The other (n = 6), were after reepithelialization (second time). In both instances, we evaluated the inflammatory infiltrate and conditions of the newly formed epithelium (HE). For immunohistochemistry, immunostaining of iNOS and MMP-9 was assessed. The average time of epithelialization in GT was 55 hours. In the GC, it was 44 hours ($p < 0.05$). At 24 h, the corneas of GT showed lower inflammatory exudation ($p < 0.01$) compared to the CG. In the second phase, the GT revealed mild inflammatory exudation ($p > 0.05$) and simple epithelial layer. The GC showed greater stratification in the newly formed epithelium. The average immunostaining of iNOS in stromal cells was higher in GT, the first and second moments compared to control group ($p > 0.05$). In the second step, the central region expressed more iNOS compared to peripheral in both TG ($p < 0.01$) and in control group ($p < 0.05$). In the epithelium, there were no significant differences in scores of iNOS immunostaining between groups and time ($p = 0.69$). The scores of immunostaining for MMP-9 in the epithelium were lower in GT compared to GC ($p = 0.69$). The average immunostaining of MMP-9 in stromal cells, the second time was greater in the central region as compared to the peripheral ($p = 0.32$). There was no correlation between the immunostaining of iNOS and MMP-9 as well as the quantity of inflammatory cells and immunostaining of iNOS. From the results, it is possible to assume that the ketorolac tromethamine 0.5%, no preservative, induced a less inflammatory exudation, and no significant changes in the expression of iNOS and MMP-9, delaying corneal epithelialisation.

Keywords: rabbit corneas, ketorolac tromethamine, iNOS and MMP-9

LISTA DE ABREVIATURAS

Óxido Nítrico	NO
Óxido Nítrico Sintase	NOS
Óxido Nítrico Sintase neuronal	nNOS / NOS-1
Óxido Nítrico Sintase endotelial	eNOS / NOS-3
Óxido Nítrico Sintase induzível	iNOS / NOS-2
Anti-inflamatórios não esteroidais	AINEs
Cicloxigenase	COX
Protaglandinas	PGEs
Lipopolissacarídeo	LPS
Interferon y	INF- y
Fator de necrose tumoral α	TNF-α
Interleucina	IL
Fator de Transformação do crescimento	TGF
Ácido 12-hidroxicosatetraenóico	HETE
Leucotrienos	LT
Matriz Extracelular	MEC
Metaloproteinase	MMP
Inibidor tecidual de Metaloproteinase	TIMP
Hidróxido de sódio	NaOH
Grupo tratado	GT
Grupo controle	GC
Hematoxilina-eosina	HE
Diaminobenzidina	DAB
Antígeno proliferador de núcleo celular	PCNA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, reativa, difusível e altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra). Sua síntese ocorre a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS), em duas etapas de oxidação do aminoácido L-arginina, produzindo, em partes iguais, L-citrulina e NO (MIRANDA et al*.,* 2000). Reconhecem-se, pelo menos, três diferentes formas de NOS, cada qual codificada por um gene específico. Duas isoformas constitutivas são continuamente expressas: a nNOS (NOS-1), que se encontra no sistema nervoso central e do periférico, e a eNOS (NOS-3), isolada na membrana plasmática de células do endotélio vascular (KNOWLES & MONCADA, 1994; CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997). Ambas são dependentes de cálcio e de calmodulina. A isoforma induzível iNOS (NOS-2), todavia, independe da presença do cálcio e da calmudolina, sendo expressa por diferentes células após a ativação transcricional, por endotoxinas ou citocinas (NATHAN, 1997).

O NO está envolvido em diversos processos, como na neurotransmissão, na vasodilatação, na defesa do hospedeiro e na inflamação (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997; MACMICKING et al., 1997; NATHAN, 1997). O NO produzido pela iNOS possui propriedades antimicrobianas e antivirais (FANG, 1997; NATHAN, 1997). Ademais, ele pode ser mediador de resposta autoimune, inflamatória e angiogênica (SENNLAUB et al., 1999). A enzima iNOS não é expressa fisiologicamente e se forma após a ativação de citocinas inflamatórias e de lipopolissacarídeos bacterianos (WOLF, 1997). A regulação da iNOS permite que altos níveis de NO possam ser sintetizados e mantidos (SCHMIDT et al., 1992). Em geral, a ação deletéria se relaciona com o NO produzido pela iNOS e não com o produzido pelas nNOS e cNOS (OHSHIMA & BARTSCH, 1994).

Nos tecidos oculares, o NO está envolvido em diversos processos (BECKMAN & KOPPENOL, 1996; BECQUET et al., 1997). *In vitro*, células do epitélio pigmentar da retina, estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS) e interferon-y (INF-y), expressaram mRNA para iNOS e liberaram nitrito, o produto final estável do NO (GOUREAU et al., 1992; GOUREAU et al., 1994; LIVERSIDGE et al., 1994; SPARROW et al., 1994). Reportou-se que epitélio do corpo ciliar expressa mRNA de

iNOS na uveíte induzida por endotoxina (GOUREAU et al., 1995; JACQUEMIN et al., 1996; MCMENAMIN et al., 1997). Demonstrou-se, *in vitro*, que a estimulação de células endoteliais e de ceratócitos de bovinos por lipopolissacarídeos e por citocinas induz à expressão da iNOS, com liberação de grande quantitativo de NO (DIGHIERO et al., 1997). Mais recentemente, verificou-se a expressão da iNOS em lesões de córnea induzidas por radiação ultravioleta (CHEN et al., 2011a).

Em pacientes humanos com ceratocone, observaram-se níveis elevados de iNOS e acúmulo de nitrotirosina, um marcador substituto para peroxinitrito (MIKKELSEN & WARDMAN, 2003), comparativamente a córneas normais ou acometidas por outras enfermidades (BUDDI et al., 2002). A elevação na síntese da iNOS se associa com a liberação de altos níveis de NO (PORASUPHATANA et al., 2003), que, por sua vez, pode reagir com moléculas de superóxido, formando peroxinitrito, com efeitos citotóxicos (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). No intuito de evitar a ação deletéria da iNOS e de seus produtos, por meio do controle da sua expressão, algumas substâncias têm sido estudadas (GOMES, 2009; CHEN et al., 2011a).

Dependendo do modelo utilizado, o NO apresentará propriedades pró ou antiangiogênicas (PAPAPETROPOULOS et al., 1997a; PAPAPETROPOULOS et al., 1997b; ZICHE et al., 1997; PARENTI et al., 1998); o que se deve, provavelmente, às diferentes isoformas de NOS nos modelos estudados, notadamente da iNOS e da eNOS. Quanto ao possível envolvimento do NO na neovascularização corneal, experimentos demonstraram que o mesmo participa da resposta angiogênica à prostaglandina E_1, substância P ou ao fator de crescimento endotelial vascular (ZICHE et al., 1994; ZICHE et al., 1997). *In vivo*, demonstrou-se que quantidades elevadas de NO podem estar envolvidas em doenças inflamatórias da córnea (DIGHIERO et al. 1997). A iNOS se expressa em córneas de ratos ulceradas quimicamente, inibindo a neovascularização (SENNLAUB et al., 1999). Descobriu-se que o peroxinitrito e o NO reduzem os níveis do Inibidor Tecidual de Metaloproteinase - 1 (TIMP-1), aumentando a atividade gelatinolítica de Metaloproteinases (MMPs) em fibroblastos corneais cultivados *in vitro* (BROWN et al., 2004).

Ceratites ulcerativas acometem o homem e os animais e podem ser de gênese traumática, cirúrgica, infecciosa, autoimune ou por ação direta de agentes químicos, além de outras causas (GALERA et al., 2009). Queimaduras por álcali destacam-se por penetrar rapidamente nas camadas da córnea, induzindo à intensa reação inflamatória, à produção de enzimas proteolíticas, de citocinas e à perda da sensibilidade corneal. Mesmo após epitelizadas, córneas acometidas por abrasões químicas podem apresentar erosões recorrentes que culminam em perfuração (HE et al., 2006). Úlceras provocadas por álcali, utilizando-se o hidróxido de sódio, têm sido utilizadas como modelo de abrasões para variados estudos (BRUNELLI, 2003; BRUNELLI et al., 2003; CAMPOS et al., 2003).

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), aplicados pela via local, têm sido investigados como opção para o tratamento da dor em abrasões corneais, pois promovem algum grau de analgesia (SZUCS et al., 2000; ALBERTI et al., 2001; RIBEIRO et al., 2010). A propriedade terapêutica do anti-inflamatório reside primariamente na sua habilidade em inibir a enzima cicloxigenase (COX). A cicloxigenase é a enzima regulatória chave que catalisa os primeiros passos na síntese das prostaglandinas (PGEs), a partir do precursor ácido araquidônico. Duas isoformas de COX foram reconhecidas, a COX-1 e a COX-2 (VANE et al., 1998). A COX-1 é uma enzima constitutiva responsável por funções homeostáticas, tais como regulação de PGEs que protegem os tecidos de danos e aceleram a reparação de lesões. A COX-2 é induzida por estímulo inflamatório associado a citocinas (IL-1, IL-2 e TNF-α), bem como a fatores de crescimento (TGF-β e fator de crescimento de fibroblasto) liberados por células migratórias (TALWAR et al., 1996; VANE e BOTTING, 1998). O cetorolaco de trometamina mostrou bons resultados em olhos acometidos por uveíte, nas ceratites ulcerativas, na conjuntivite alérgica, na degeneração macular, no pós-operatório de cirurgias refrativas e em facectomias (WHATERBURY & FACH; 2006, SCHECHTER, 2008).

Embora a administração local de AINEs esteja aumentando na prática oftálmica, há evidências de que ela pode induzir a alterações na superfície ocular com danos às células epiteliais da conjuntiva e da córnea (KITAOJI et al., 1991). AINES utilizados como analgésicos, nas ceratites ulcerativas, podem retardar a epitelização e potencializar a degradação do estroma corneal (REVIGLIO et al.,

2003; RIBEIRO et al., 2010). O cetorolaco de trometamina é um AINE não seletivo, que inibe as cicloxigenases-1 e -2, promovendo supressão da liberação das prostaglandinas com diminuição da inflamação e da dor (BERNARDINI e NASSARALLA, 2001; RIBEIRO et al., 2010).

Muitos estudos suportam a hipótese de que os efeitos não desejados da terapia padrão com anti-inflamatórios não esteroidais resultam da propriedade de inibir COX-1, enquanto os efeitos anti-inflamatórios o são pela inibição da COX-2 (WHITTLE et al., 1980; DUBOIS et al., 1998). Admite-se que o bloqueio da COX desvia precursores para a via lipoxigensase, que pode produzir metabólitos intermediários pró-inflamatórios bem conhecidos (ácido 12-hidroxicosatetraenóico [HETE], leucotrienos B4 [LTB4], produtos da 5-lipoxigenase) (VANE et al., 1998). Outras pesquisas mostraram potencial intrínseco do receptor LTB4 em neutrófilos de pacientes humanos e em espécies animais, com evidências de que metabólitos do LTB4 e 12-HETE estão diretamente envolvidos na patogênese do retardo da reparação cicatricial (WIGGINS et al., 1990; SHOWELL et al., 1995).

A matriz extracelular (MEC) corneal tem papel ativo na regulação das células epiteliais e estromais da córnea, influenciando no seu desenvolvimento, migração, proliferação e funções metabólicas. Regular o balanço entre degeneração e regeneração da MEC é crucial para o reparo e manutenção das propriedades estruturais da córnea. Muitas enzimas, incluindo as metaloproteinases (MMPs) estão envolvidas na remodelação da MEC associadas à reparação de úlceras corneais (FINI et al., 1992; GARRANA et al., 1999).

MMPs pertencentes ao grupo das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) estão entre os principais agentes promotores da degradação da MEC e dos componentes da membrana basal corneais (WOESSNER e NAGASI, 2002; VISSE e NAGASI, 2003). A MMP-2 e a MMP-9 são responsáveis pelo processo degradativo dos colágenos tipos I, IV, V, VII e X, fibronectina, gelatina e galectina-3 (FINI et al., 1992; GARRANA et al., 1999). A MMP-9 é produzida por células epiteliais e por neutrófilos (OLLIVIER et al., 2007). Reportou-se maior atividade da MMP-1 em células epiteliais e da MMP-2 e da MMP-9 na remodelação do estroma corneal e na ceratectomia lamelar em coelhos (MULHOLLAND et al., 2005). Após injúrias neuronais, a MMP-9

corrobora com a instalação da dor neuropática precoce, pela liberação de IL-1β e por ativação microglial (KAWASAKI et al., 2008).

Em córneas aviltadas, após a sinalização de diferentes citocinas, MMPs perdem peso molecular e se tornam ativas. Tais MMPs degradam a MEC, as proteínas celulares de superfície, citocinas, inibidores teciduais de outras proteases, além de atuarem na ativação de proteases latentes. A manutenção e o reparo da matriz extracelular da córnea requerem equilíbrio entre a síntese de componentes da matriz extracelular e as suas degradação e remodelação (SIVAK & FINI, 2002; BROOKS & OLLIVER, 2004).

AINEs utilizados em ceratites ulcerativas podem retardar a reparação e potencializar a degradação do estroma corneal (HENDRIX et al., 2002; RIBEIRO et al., 2010). Atribuiu-se este efeito ao conservante utilizado nas formulações oftálmicas (GASSET et al., 1974; BECQUET et al., 1997). Entretanto, demonstrou-se elevação da expressão de diferentes metaloproteinases na córnea de ratos, após a instilação do diclofenaco sódico e do cetorolaco de trometamina, mesmo desprovidos de conservante (REVIGLIO et al., 2003). Observou-se maior expressão de MMPs em ratos tratados com diclofenaco sódico, comparativamente ao cetorolaco, sem conservante (REVIGLIO et al., 2003). Mesmo desprovidas de conservante, soluções oftálmicas compostas por AINEs exercem efeitos danosos ao epitélio corneal (RIBEIRO et al., 2010).

Sabe-se que a MMP-9 está envolvida na degradação do estroma corneal, facilitando a proliferação e a migração de neovasos em úlceras (MULHOLLAND et al., 2005). Trabalhos mostraram a expressão da iNOS em úlceras de córnea provocadas por álcali, entretanto, desconhece-se o efeito de AINEs sobre sua atividade em córneas aviltadas. Um único trabalho demonstrou o papel da iNOS na inibição da vascularização após abrasão corneal (SENNLAUB et al., 1999). Considerando-se que o cetorolaco de trometamina é utilizado para controle da dor no tratamento de afecções corneais, pareceu oportuno estudá-lo quanto à expressão da iNOS e da MMP-9 na reparação de úlceras de córnea suscitadas por álcali. A ação epiteliotóxica do fármaco (RIBEIRO et al., 2010) pode elevar a expressão de MMPs (REVIGLIO et al., 2003) e a sua atividade pode estar aumentada pela ação da iNOS, conforme demonstrado, *in vitro* (BROWN et al., 2004). Como hipótese,

espera-se que o cetorolaco iniba a migração de neovasos, bem como a exsudação inflamatória.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliarem-se os efeitos do cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, na imunomarcação da iNOS e da MMP-9 em córneas de coelhos ulceradas por hidróxido de sódio (NaOH).

2.2 Objetivos específicos

Avaliarem-se aspectos clínicos, tempo de epitelização e características histológicas de córneas ulceradas e tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante.

Identificar-se a imunomarcação da iNOS e da MMP-9, por imunoistoquímica, no estroma e epitélio de córneas ulceradas e tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, em diferentes momentos.

Avaliarem-se possíveis correlações entre a imunomarcação das enzimas iNOS, MMP-9 e a exsudação inflamatória, relativamente à utilização do cetorolaco de trometamina à 0,5%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas internacionais da *Association For Research In Vision And Ophthalmology* (OFFICE OF LABORATORY ANIMAL WELFARE, 2013), de consoante com o código de NÜREMBERG (GOLDIN, 1995) e ao preceituado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, sob o número de protocolo 007616/11, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus Jaboticabal.

3.1 Animais

Selecionaram-se 12 coelhos (*Oryctolagus cuniculus* – Linnaeus, 1758) machos, da raça Nova Zelândia Branco, com peso médio de 3,4 kg e 120 dias de idade.

Para a sua admissão na pesquisa, eles foram avaliados, sob os pontos de vista sistêmico e oftálmico, empregando-se o Teste da lágrima de Shirmer[1], a biomicroscopia com lâmpada em fenda[2], a tonometria de aplanação[3], a oftalmoscopia binocular indireta[4], e a prova da flouresceína[5]. Uma vez selecionados, foram individuamente mantidos em ambiente ventilado, em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, com dieta à base de ração comercial e água potável *ad libitum*.

3.2 Procedimentos

Após indução da anestesia, por injeção intramuscular de 15 mg/kg de cetamina[6] associada a 0,5 mg/kg de midazolam[7], realizou-se a tricotomia periocular. Posteriormente, instilou-se uma gota de proximetacaína[8] e procedeu-se à antissepsia da córnea, do saco conjuntival e da conjuntiva com iodo-polivinil-pirrolidona[9] diluído em solução fisiológica[10] (1:50). A anestesia foi obtida empregando-se máscara com isofluorano[11], diluído em oxigênio a 100%, em circuito aberto.

Após preparação do campo operatório e exposição ocular com blefarostato barraquer[12] de 3 cm, um disco de papel filtro[13], com 6,0 mm de diâmetro, foi embebido em solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 mol/L e colocado sobre a região paracentral da córnea (Figura 1), por um minuto. Ato contínuo, realizou-se a lavagem copiosa com solução salina à 0,9%, durante um minuto. As intervenções foram realizadas empregando-se microscópio cirúrgico[14].

---

[1] Teste da Lágrima de Schirmer – Ophthalmos Ltda., São Paulo/SP, Brasil.
[2] XL-1 Slit lamp® – Shin-Nippon, Japão.
[3] Tono Pen XL®, Medtronic, Jacksonville, E.U.A.
[4] Oftalmoscópio binocular indireto FOH-5® – Eyetec S.A.
[5] Fluoresceína strips® – Ophthalmos Ltda., São Paulo / SP, Brasil.
[6] Cetamin S+®-Cristália, São Carlos / SP, Brasil.
[7] Dormire®-Cristália, São Carlos / SP, Brasil.
[8] Anestalcon®, Alcon, São Paulo / SP, Brasil.
[9] Laboriodine – Glicolabor Ind. Farmacêutica Ltda, Ribeirão Preto / SP, Brasil.
[10] Solução de Cloreto de Sódio à 0,9% - JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto / SP, Brasil.
[11] Forane®-Cristália, São Carlos / SP, Brasil.
[12] Steel Inox®, Engenheiro Coelho / SP, Brasil.
[13] © Whatman 40 – F. Maia Ltda, Cotia / SP, Brasil.
[14] MC-M902®, DF Vasconcelos, São Paulo / SP, Brasil.



Figura 1. Imagens fotográficas ilustrando etapas da confecção das úlceras corneais em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Em A, embebimento de disco de papel Filtro Whatman 40 em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L. Em B, colocação do disco em região paracentral da córnea. Em C, lesão corneal resultante imediatamente após a lavagem (seta). Jaboticabal, SP, 2013.

3.3 Tratamento e colheita das córneas

Imediatamente após a realização das lesões, o olho esquerdo foi tratado com 30 µl de cetorolaco de trometamina à 0,5%[15], sem conservante (GT), e o direito recebeu, com iguais critérios, solução salina à 0,9% (GC), ambos a intervalos regulares de seis horas, até a colheita das córneas (Figura 2).

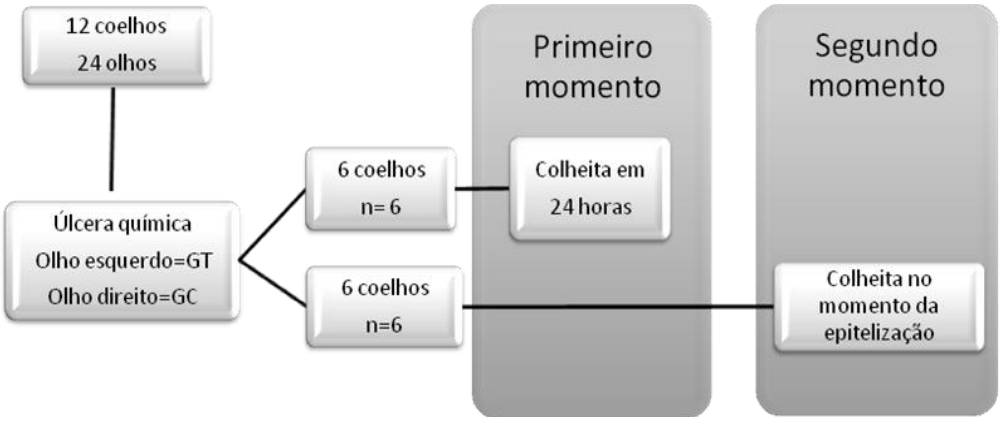


Figura 2. Fluxograma relativo às etapas, procedimentos e colheita de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratados com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (GT) ou com solução salina à 0,9% (GC).

[15] Acular sem conservante® , Allergan, Guarulhos / SP, Brasil.

As colheitas ocorreram em dois momentos. Decorridas 24 horas (primeiro momento) das lesões iniciais, seis animais (n=6) de cada grupo foram submetidos à eutanásia ativa com sobredose de isofluorano[11]. O mesmo se repetiu com o restante dos coelhos, após epitelização corneal (segundo momento) de ambas as córneas. As mesmas foram colhidas e processadas para análise histológica e imunoistoquímica.

3.4 Avaliação clínica

Os animais foram avaliados clinicamente quanto ao blefaroespasmo e à hiperemia conjuntival, a cada 6 horas, após a indução das lesões, até sua colheita. Empregou-se a biomicroscopia com luz em fenda, previamente aos tratamentos. Os eventos foram quali-quantificados em scores (0 - ausente, 1 - leve, 2 - moderado, 3 - severo).

Para o monitoramento do tempo médio de reepitelização, empregou-se teste do tingimento pela fluoresceína[16] e avaliou-se por meio da biomicroscopia com luz em fenda e filtro azul de cobalto a cada 6 horas horas até a sua epitelização.

Para quali-quantificação da área ulcerada, os olhos foram fotografados em biomicroscópio com luz difusa, acoplado a câmera fotográfica[17], a uma distância focal fixa de 4 cm, e as imagens foram avaliadas em *software*[18] (STERN et al., 2006).

3.5 Histologia

As córneas foram processadas e analisadas no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, UNESP – Jaboticabal.

As córneas foram colhidas com corte circunferencial realizado na esclera imediatamente adjacente ao limbo, foram mantidas em formol tamponado à 10%, durante 24 horas e, posteriormente, em solução alcoólica à 70%, durante 3 dias. O material foi processado (banhos sucessivos em álcool 80%, 90%, 95%, absoluto I,

[16] Fluoresceína em tiras®, Ophthalmos – São Paulo / SP, Brasil
[17] Slit Lamp - Eagle Hawk Eye®, Dioptrix, França
[18] Image J, disponível em: http://rsbweb.nih.gov/ij

absoluto II e xilol), incluído em parafina e cortado em micrótomo à espessura de 5 µm. De cada amostra, foram preparadas duas lâminas com cortes sagitais, percorrendo a área da lesão, e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico quanto às condições e ao número de camadas do epitélio neoformado. Avaliaram-se as características do estroma neoformado quanto a celularidade e disposição das fibras colágenas.

Para os eventos relativos à infiltração de leucócitos polimorfonucleares e de mononucleares, realizou-se contabilização com a objetiva de 40 vezes, de dez campos aleatórios em região central e outros dez em região periférica das córneas. A soma desses valores representou o total de células do infiltrado inflamatório no estroma corneal.

3.6 Imunoistoquímica

Cortes de 4 µm de espessura foram confeccionados em lâminas eletricamente carregadas e processados, empregando-se a técnica complexo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidase, para marcação da iNOS e da MMP-9. Foram desparafinizados e hidratatos em bateria de álcool, seguiu-se bloqueio da proteína endógena[19]. A recuperação antigênica foi realizada sob calor e pressão[20] em solução tamponada de citrato de sódio 10 mM, em pH 6,0. Foram adicionados os anticorpos primários policlonais iNOS e MMP-9 nas diluições de 1:600 e 1:200 (v/v), respectivamente, e o material foi incubado em câmara úmida, escura, a 23°C durante 14 horas. Como anticorpo secundário, utilizou-se o polímero ligado à peroxidase[21], foi incubado em câmara úmida e escura durante uma hora, após a qual realizou-se a revelação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB)[22]. A contracoloração foi obtida com hematoxilina de Harris.

Como controle positivo para iNOS, utilizou-se granuloma provocado por inócuo de BCG em músculo estriado esquelético de peixe *Piaractus mesopotamicus* (MANRIQUE, 2012). Para MMP-9, utilizou-se adenocarcinoma mamário de cadela

[19] Protein Block – DAKO® X0909
[20] Panela Pascal – DAKO® S2800
[21] ADVANCE – DAKO® K4069 HRP. Rabbit/Mouse
[22] DAB, EnVision + System-HRP - DAKO®

(YOKOTA, 2001). Como controle negativo, excluiu-se o anticorpo primário da reação, conservando os outros passos.

Em cada uma das etapas, as lâminas foram lavadas 3 vezes, durante 5 minutos, empregando-se solução PBS pH 7,4.

Para avaliar-se a imunomarcação, realizou-se contabilização, com a objetiva de 40 vezes, de dez campos aleatórios em região central e outros dez em região periférica das córneas. A soma desses valores representou o total de imunomarcação no estroma corneal.

Para a contabilização da imunomarcação em epitélio, estimou-se o percentual de marcação em dez campos em região de epitélio neoformado. Ao final, extraiu-se a média dos valores obtidos. Para tal, empregou-se índice semi-quantitativo (STERN et al., 2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação, por índice semi-quantitativo, da imunomarcação em epitélio de córneas

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

Fonte: STERN et al. (2006)

3.7 Estatística

Os dados foram avaliados, quanto à sua normalidade, ao teste de Kolmogorove Smirnov. Empregou-se análise de variância para medidas repetidas, com posterior análise pelo teste de Bonferroni ou Tukey. Possíveis correlações entre o escore de imunomarcação da iNOS e da MMP-9 e entre iNOS e células inflamatórias foram analisadas empregando-se o teste de Pearson. Adotou-se nível mínimo de significância de $p<0,05$. Os resultados encontram-se expressos em média e erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica

O blefarospasmo foi significativamente menos intenso em GT nas primeiras 12 horas (p<0,001), comparativamente ao GC. O blefarospasmo diminuiu a partir das 18 horas e foi ausente às 24 horas no GT. Ausência de blefarospasmo só foi observada às 30 horas no GC. Após 30 horas, o parâmetro manteve-se ausente em ambos os grupos até a colheita (Figura 3).

A hiperemia conjuntival foi significativamente menos intensa em GT nas primeiras 24 horas (p<0,001), comparativamente a GC. Após 24 horas, houve redução do parâmetro, mas em níveis ainda maiores que em GT (Figura 4).

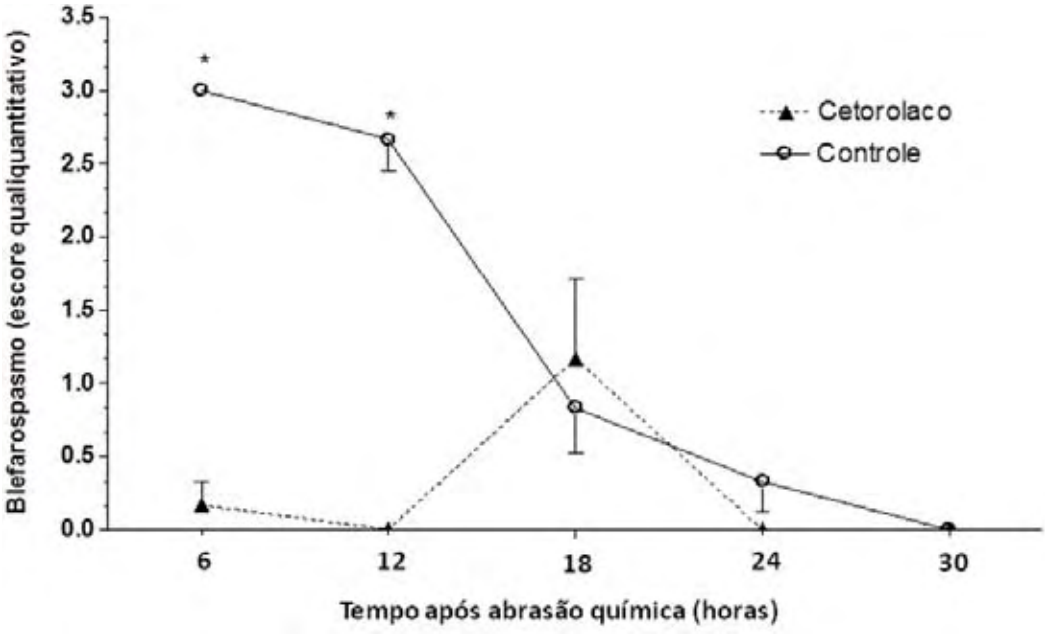


Figura 3. Média e erro padrão dos valores do blefarospasmo, em distintos períodos da avaliação, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1mol/L, tratados com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (GT), ou com solução salina à 0,9% (GC). Jaboticabal, SP, 2013.

***Teste Tukey (p<0,001)**

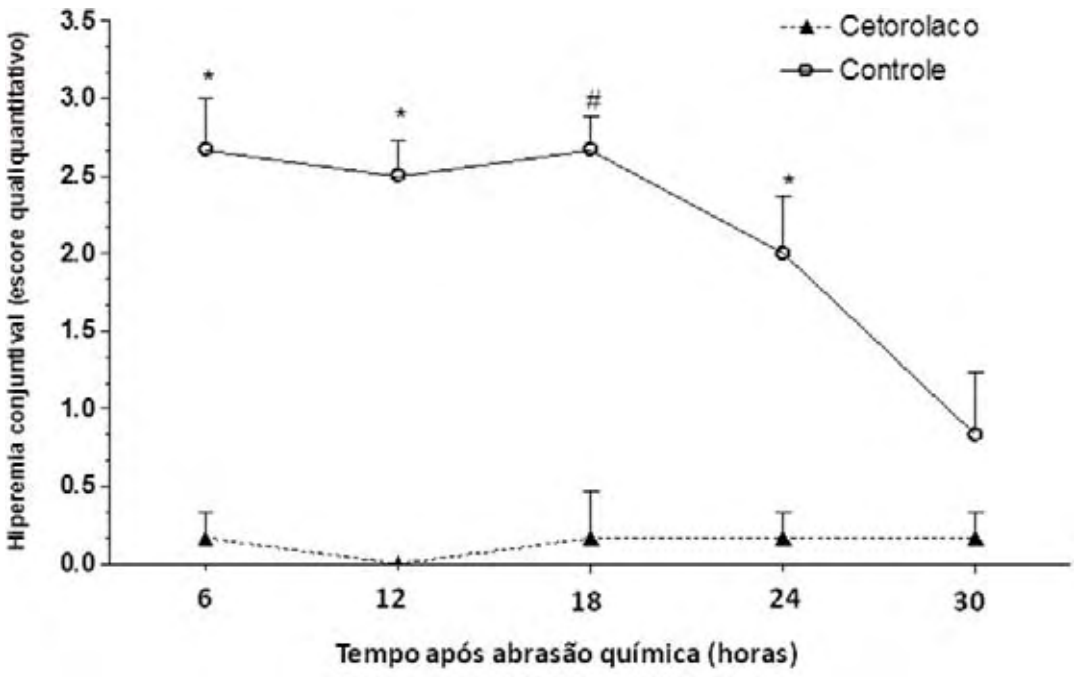


Figura 4. Média e erro padrão dos valores de hiperemia conjuntival, em distintos períodos da avaliação, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1mol/L, tratados com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (GT), ou com solução salina à 0,9% (GC). Jaboticabal, SP, 2013.
***Teste Tukey ($p < 0,001$)*, ($p < 0,01$)$^{\#}$**

Relativamente ao diâmetro das áreas ulceradas, nas córneas tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (GT), os valores foram, em micrômetros (µm), sempre superiores aos controle (GC) em todos os períodos da avaliação (Figura 5). Observou-se tempo médio de reepitelização, para o grupo tratado, de 55 horas, e para o grupo controle, de 44 horas (Figura 5 e 6). O tempo médio para que o teste do tingimento pela fluoresceína fosse negativo (horas), diferiu significativamente entre os olhos tratados (GT) e os olhos controle (GC) ($p<0,05$) (Figura 5).

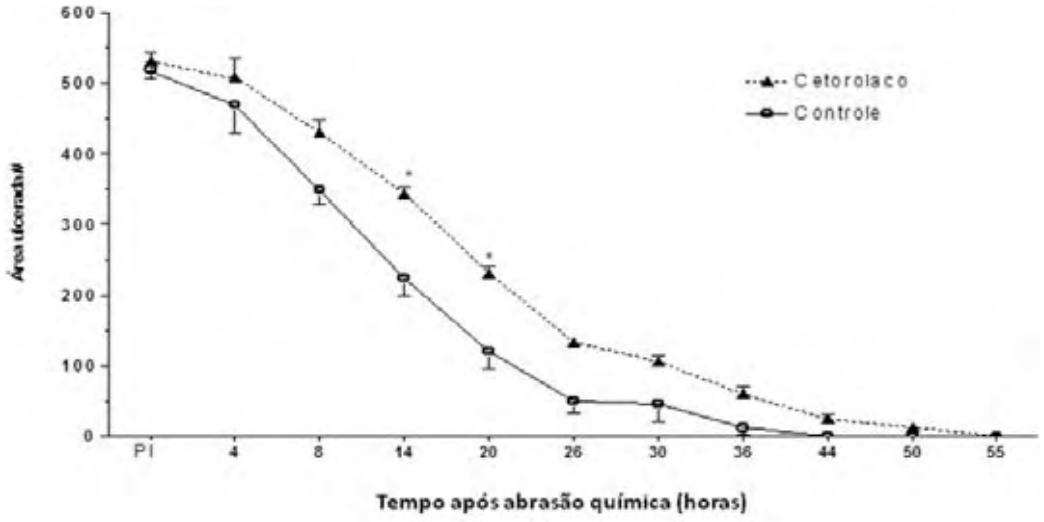


Figura 5. Média e erro padrão* da área corneal ulcerada, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratados com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, ou com solução salina à 0,9%. PI = Pós-operatório imediato. Jaboticabal, SP, 2013.

***Teste Tukey (p<0,01)**.



Figura 6. Imagens fotográficas ilustrando a progressão da epitelização corneal, em olhos de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratados com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (GT) (A, B e C) ou com solução salina à 0,9% (GC) (D, E e F). Em A e D, observam-se úlceras de córnea logo após a abrasão química. Em B e E, observam-se úlceras de córnea após 24 horas da abrasão química. Notar maior extensão da úlcera no GT (B). Em C, observa-se área de úlcera às 44 horas da abrasão química, no GT. Em F, observa-se epitelização às 44 horas da abrasão química, no GC. Jaboticabal, SP, 2013.

4.2 Histologia

O epitélio corneal neoformado mostrou características distintas entre os olhos tratados e os não tratados. Cortes corados pela hematoxilina e eosina exibiram áreas desnudas mais extensas nas córneas tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, comparativamente ao grupo controle, decorridas 24 horas. O epitélio neoformado em GT caracterizou-se, em sua maioria, por uma monocamada (Figura 7A). As córneas controle apresentaram epitélio neoformado alternando áreas de camadas simples e estratificadas (Figura 7C). Dois indivíduos do grupo controle apresentaram apenas camada simples de epitélio neoformado.

Decorridas 55 horas do trauma químico (Figura 7B), as córneas tratadas mostraram-se epitelizadas, por vezes, com áreas de epitélio em dupla camada ainda não aderido no centro da lesão. Córneas controle, no entanto, já evidenciavam estratificação (Figura 7D). Em quatro indivíduos do grupo GT, observou-se degeneração balonosa hidrópica, junto à margem da lesão, desaparecendo na direção do epitélio límbico.

Quanto às condições do estroma, em ambos os grupos e momentos, encontraram-se baixa celularidade e desorganização das fibras colágenas, caracterizando edema.

Relativamente à exudação inflamatória, ela foi mais intensa nos olhos que receberam solução salina à 0,9% (Figura 8). No primeiro momento de avaliação, nas córneas tratadas observou-se menor quantitativo de infiltração inflamatória (Figura 8A). No mesmo período, nas controles encontraram-se marginação e diapedese de polimorfonucleares, com predomínio de neutrófilos e de raros mononucleares (Figura 8C). Decorridas 55 horas, as córneas tratadas mostraram discreta reação inflamatória (Figura 8B), com raros polimorfonucleares e mononucleares, comparativamente às controles, em que se observou moderada exsudação inflamatória (Figura 8D).

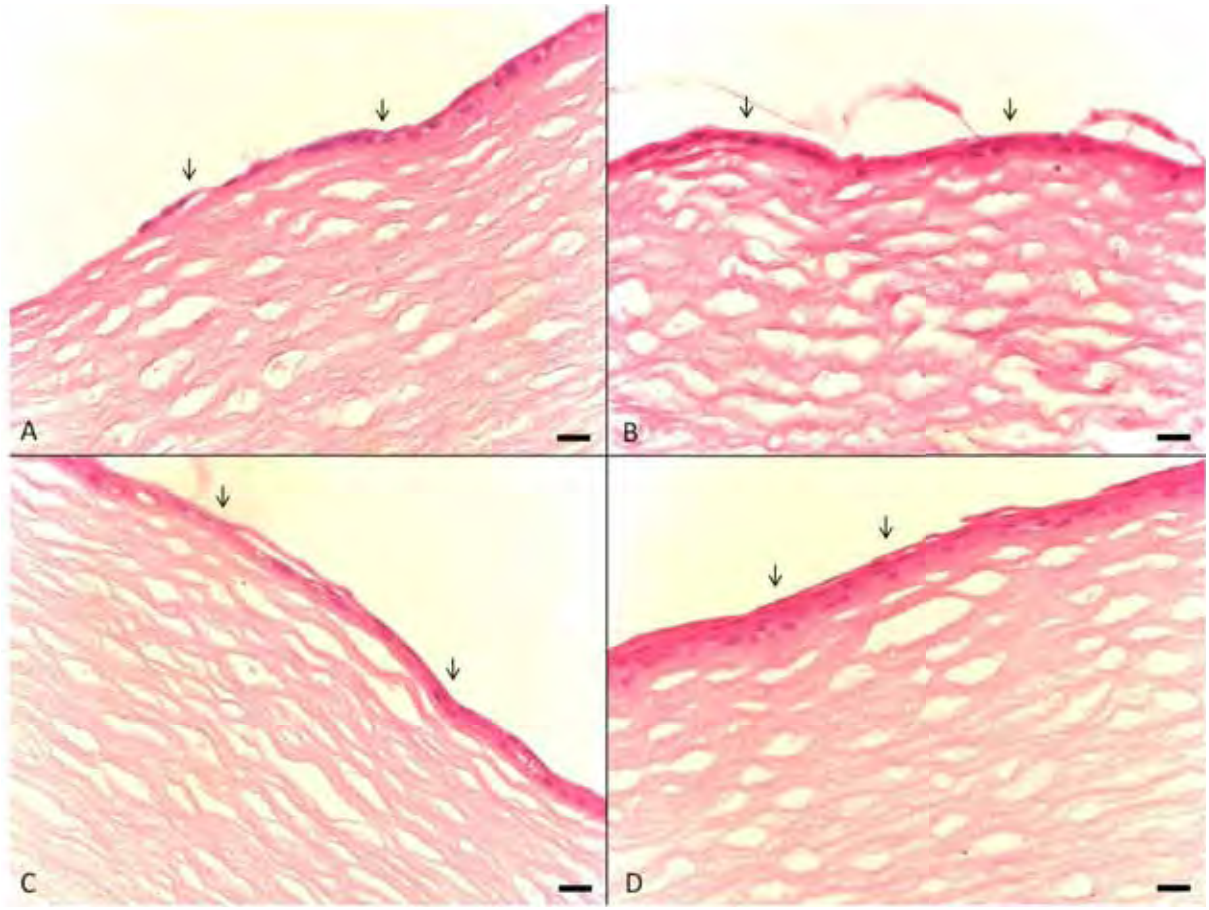


Figura 7. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (A e B), ou com solução salina à 0,9% (C e D). Em A, monocamada de epitélio neoformado (setas) adjacente à úlcera em córnea tratada, após 24 horas do início da lesão. Em B, mono e dupla camadas de epitélio neoformado (setas) em córnea tratada, após 55 horas do início da lesão. Em C, mono e dupla camada de epitélio neoformado (setas), em córnea controle, após 24 horas do início da lesão. Em D, estratificação do epitélio neoformado (setas), em córneas controle, decorridas 55 horas do início da lesão. Jaboticabal, SP, 2013. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50 µm).

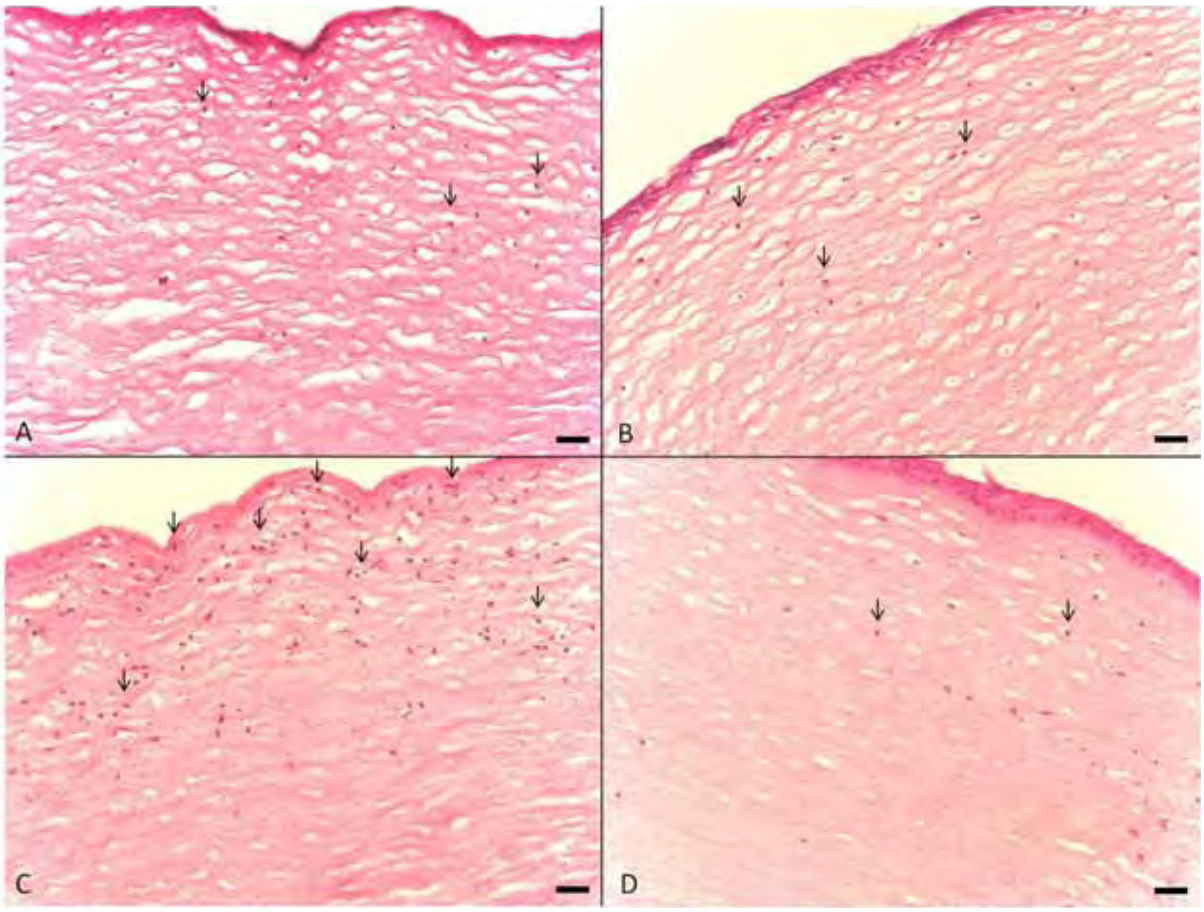


Figura 8. Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (GT) (A e B), ou com solução salina à 0,9% (GC) (C e D). Em A, infiltrado inflamatório (setas) em córnea tratada, após 24 horas do início da lesão. Em B, infiltrado inflamatório (setas) em córnea tratada, após 55 horas do início da lesão. Em C, infiltrado inflamatório (setas), em córnea controle, após 24 horas do início da lesão. Em D, infiltrado inflamatório (setas), em córnea controle, decorridas 55 horas do início da lesão. Jaboticabal, SP, 2013. Hematoxilina e eosina. (Barra = 50 µm).

Relativamente à média da contagem de células inflamatórias nas córneas, 24h após a injúria, no grupo tratado ela foi significativamente menor (519,2±46,86), comparativamente ao grupo controle (2119±266,1) ($p<0,001$). Às 55 horas, as córneas tratadas (706,8±57,67) apresentaram menor quantitativo de células inflamatórias, comparativamente às do grupo controle (1238±151,6). Entretanto, não houve diferença significativa entre ambos ($p>0,05$) (Fig. 9). A média de células inflamatórias em GT, no primeiro momento, manteve-se semelhante comparativamente ao mesmo grupo no segundo momento, enquanto no GC, esta

média diminuiu significativamente (p<0,01) do primeiro para o segundo momento (Figura 9).

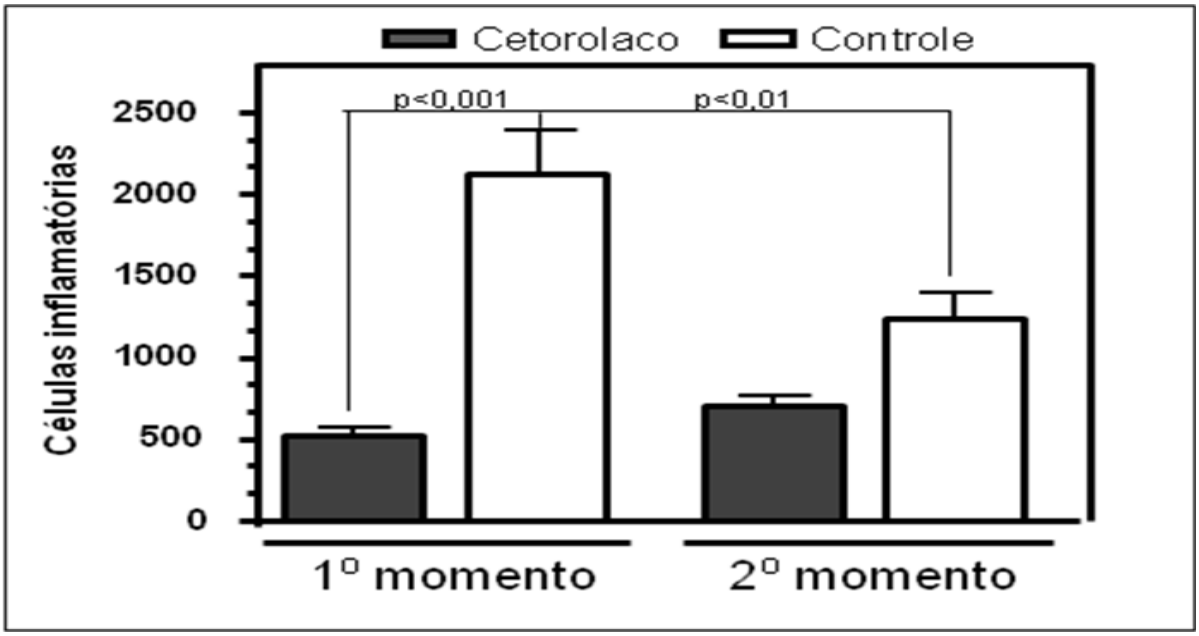


Figura 9. Média e erro padrão* do quantitativo de células inflamatórias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução salina à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.
***Teste Bonferroni**

O quantitativo de células inflamatórias, na periferia das córneas, às 24h, foi significativamente menor no grupo tratado (395,5±40,97), comparativamente ao grupo controle (1644±246,6) (p<0,001). Esses valores foram igualmente menores na região central do grupo tratado (159,7±25,06) às 24 horas, comparativamente ao grupo controle (474,8±104,3), mas não significativos (p>0.05). Ainda no primeiro momento, o quantitativo de células inflamatórias na periferia da córnea controle (1644±246,6) foi significativamente maior, comparativamente à região central (474,8±104,3) das córneas do mesmo grupo (p<0,001) (Figura 10).

No segundo momento, o quantitativo de células inflamatórias nas regiões periféricas do grupo tratado foi menor (430,5±71,41), comparativamente às mesmas regiões do grupo controle (960,3±170,3). Na região central, encontraram-se valores semelhantes para o grupo tratado (276,3±30,11) e para o grupo controle

(277,8±40,53). Quando comparados, não se observaram diferenças significativas (p>0.05) (Figura 10).

O quantitativo de células na periferia das córneas do grupo controle diminuiu significativamente do primeiro para o segundo momento (p<0,01) (Figura 10).

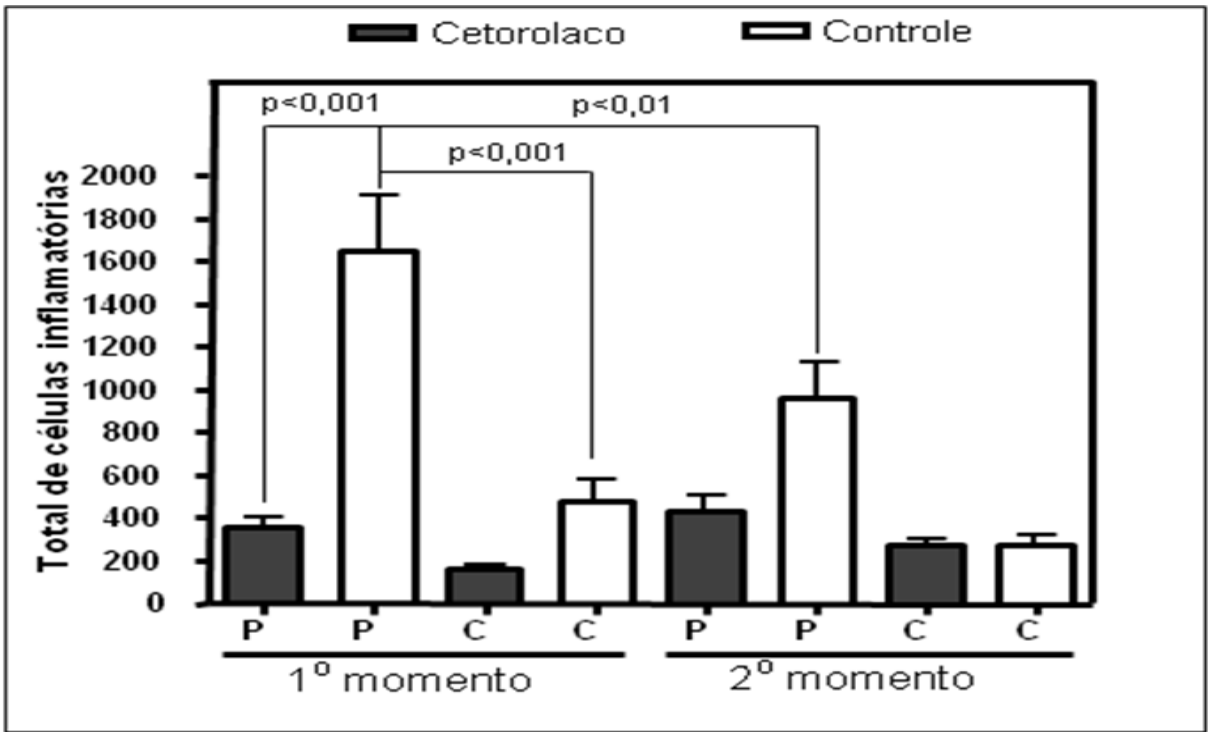


Figura 10. Média e erro padrão* do quantitativo de células inflamatórias na periferia (P) e no centro (C) de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução salina à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.

***Teste Bonferroni**

4.3 Imunoistoquímica

Relativamente ao iNOS, observou-se imunomarcação de polimorfonucleares, de mononucleares e de ceratócitos (Figura 11) no estroma das córneas. A imunomarcação foi mais intensa na região adjacente à lesão. Evidenciou-se imunomarcação do epitélio mais intensa às margens da lesão à similitude da expressão em células do estroma. Ademais, notou-se imunomarcação no citoplasma e no núcleo das células envolvidas.

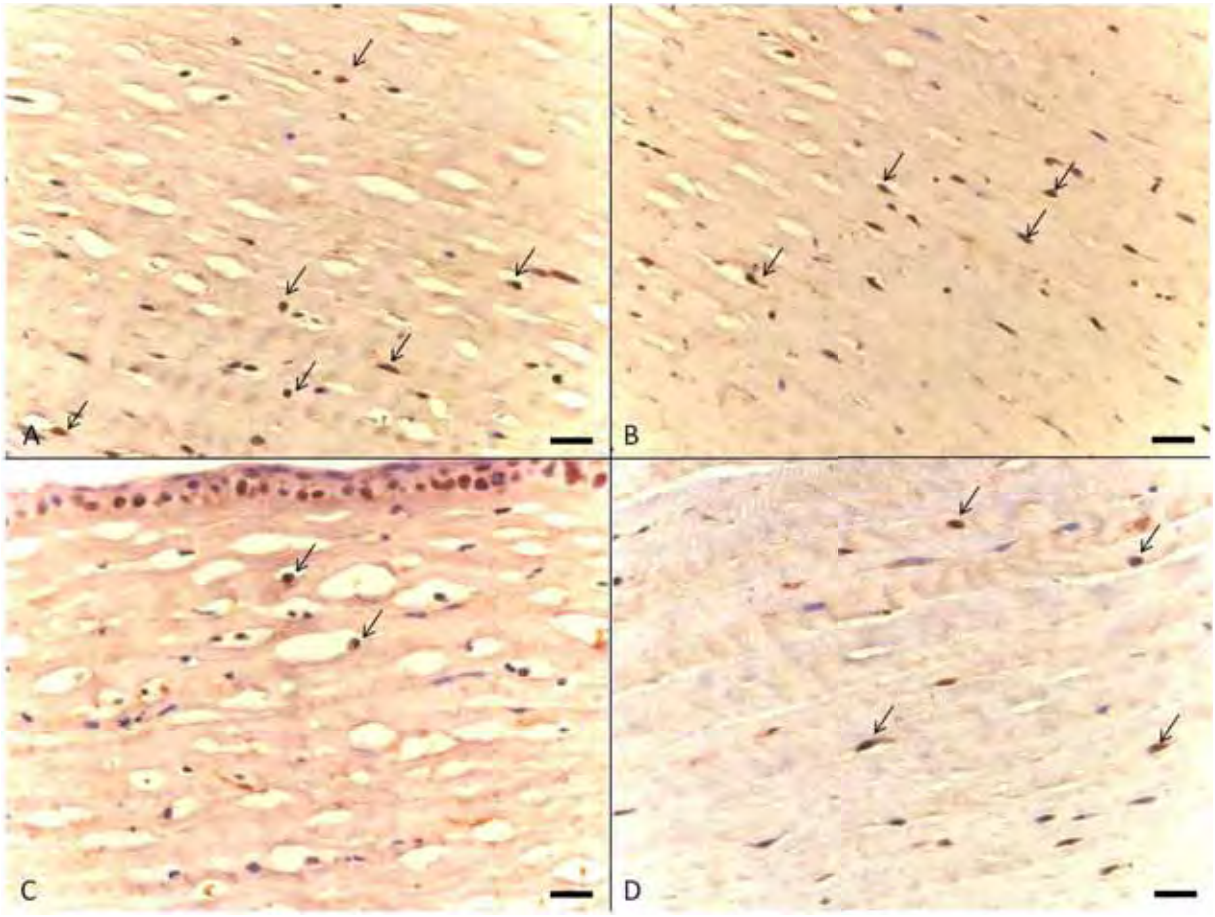


Figura 11. Fotomicrografia da imunomarcação da iNOS em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratada com cetorolaco de trometamina à 0,5% (A e B), sem conservante, ou com solução salina à 0,9% (C e D). Em A, células imunomarcadas (setas) no estroma de córnea tratada, após 24 horas do início da lesão. Em B, células imunomarcadas (setas) no estroma de córnea tratada, após 55 horas do início da lesão. Em C, células imunomarcadas (setas) no estroma de córnea controle, após 24 horas do início da lesão. Em D, células imunomarcadas (setas) no estroma de córnea controle, após 55 horas do início da lesão. Jaboticabal, SP, 2013. Diaminobenzidina. (Barra = 50 µm).

Quanto à expressão da iNOS nas células do estroma, às 24 horas, observou-se maior expressão no grupo tratado (50,17±15,11), comparativamente ao controle (25,83±9,14). No segundo momento, a média do quantitativo de células imunomarcadas manteve-se maior no grupo tratado (63,33±11,93) comparativamente ao controle (58,17±9,68). Não se demonstrou diferença significativa entre os grupos (p=0,072) (Figura 12).

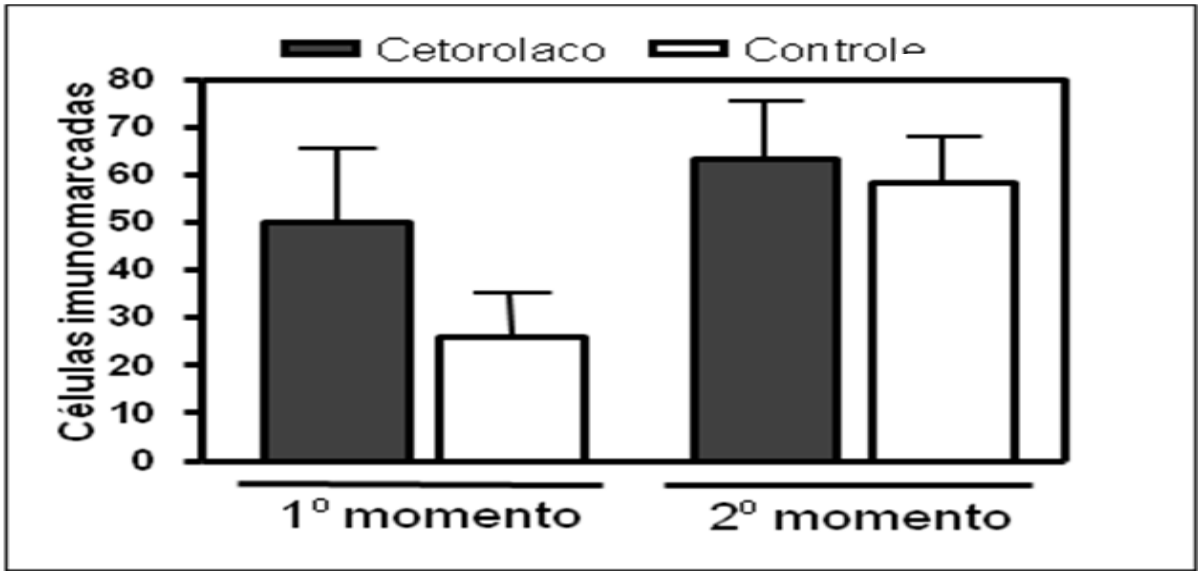


Figura 12. Média e erro padrão* do quantitativo de imunomarcação da iNOS em células estromais de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução fisiológica à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.

***Análise de Variância para Medidas Repetidas (p=0,07)**

Quando se analisaram a periferia e o centro das córneas, às 24 horas, observou-se maior expressão da iNOS na periferia (12,5±5,07) e no centro (37,67±10,03) das córneas do grupo tratado, comparativamente à periferia (8,16±4,58) e ao centro (17,67±5,81) das córneas do grupo controle. No segundo momento, obteve-se expressão significativamente maior na região central (48,83±9,39) das córneas tratadas, comparativamente a região periférica (14,5±2,88) do mesmo grupo ($p<0,01$). Similarmente, a expressão da iNOS na região central (45,5±7,43) das córneas controles foi significativamente maior, comparativamente a região periférica (12,67±5,07) do mesmo grupo ($p<0,05$) (Figura 13).

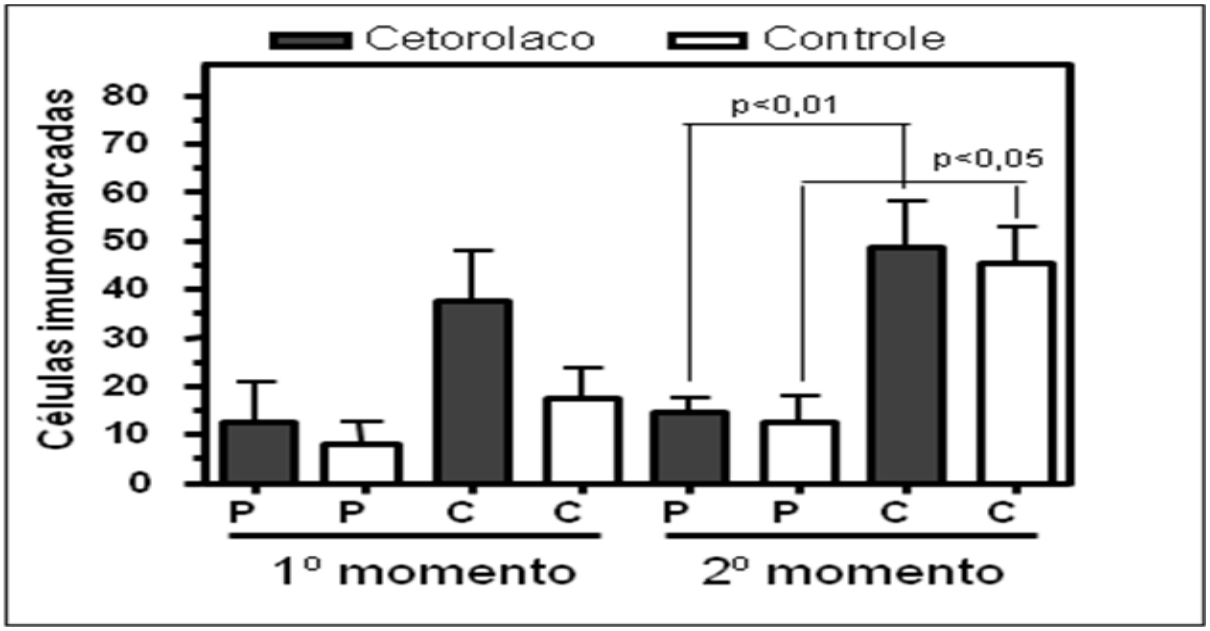


Figura 13. Média e erro padrão* do quantitativo de imunomarcação da iNOS em células estromais na periferia (P) e no centro (C) de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução salina à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.

***Teste Bonferroni**

Quanto à expressão da iNOS no epitélio das córneas, no primeiro momento a imunomarcação no grupo tratado (1,5±0,22) foi similar à do grupo controle (1,5±0,42). No segundo momento, observou-se menor expressão da iNOS no grupo tratado (1,5±0,22) comparativamente ao controle (2±0,44), porém sem diferença significativa (p=0.69) (Figura 14).

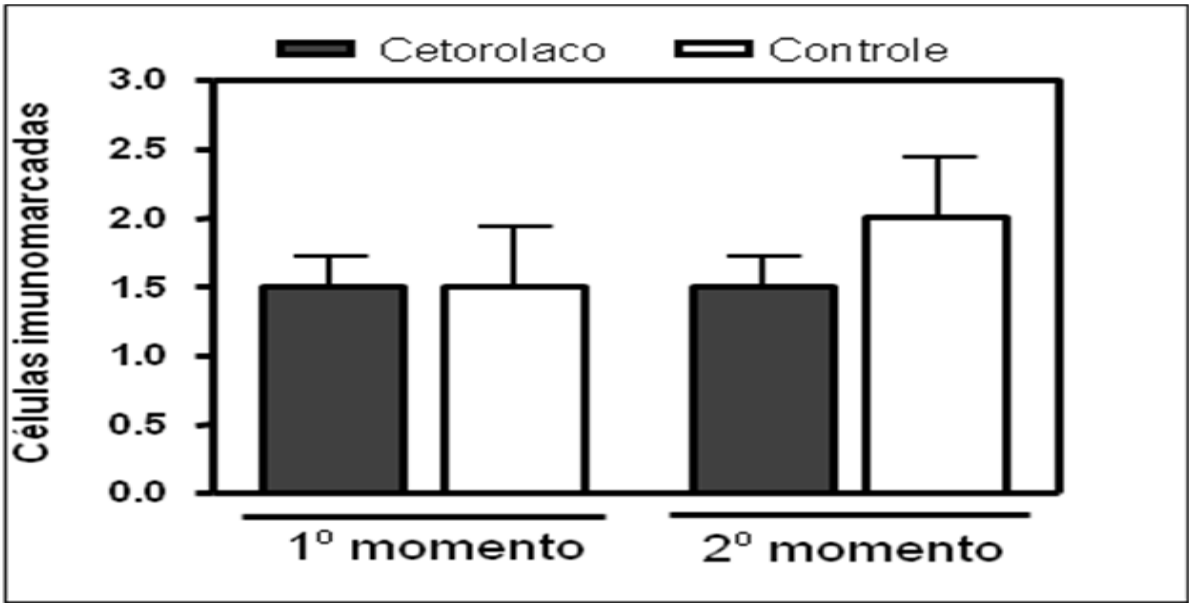


Figura 14. Escore de imunomarcação e erro padrão* da iNOS em epitélio de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução salina à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.

***Análise de Variância para Medidas Repetidas (p=0,69)**

Relativamente a MMP-9, evidenciou-se imunomarcação no epitélio das córneas tratadas e das controles (Figura 15). A imunomarcação das células foi predominantemente citoplasmática. Houve expressão de MMP-9, em menor quantitativo, em ceratócitos, em polimorfonucleares e mononucleares do infiltrado inflamatório.

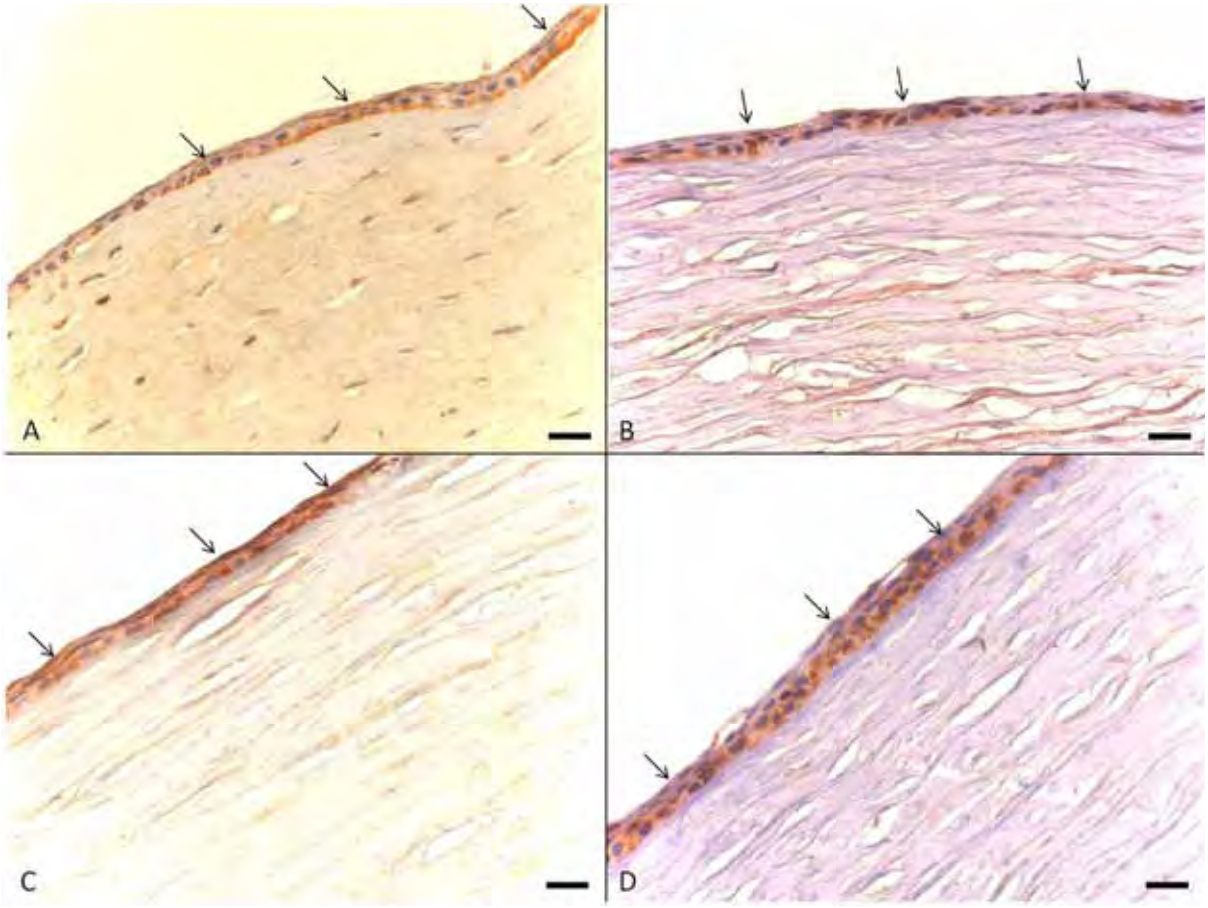


Figura 15. Fotomicrografia da imunomarcação da MMP em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratada com cetorolaco de trometamina à 0,5% (A e B), sem conservante, ou com solução salina à 0,9% (C e D). Em A, imunomarcação do epitélio (setas) de córnea tratada, após 24 horas do início da lesão. Em B, imunomarcação do epitélio (setas) de córnea tratada, após 55 horas do início da lesão. Em C, imunomarcação do epitélio (setas) de córnea controle, após 24 horas do início da lesão. Em D, imunomarcação do epitélio (setas) de córnea controle, após 55 horas do início da lesão. Jaboticabal, SP, 2013. Diaminobenzidina. (Barra = 50 µm).

Quando se avaliou o escore de imunomarcação no epitélio das córneas tratadas às 24 horas, observou-se menor expressão de MMP-9 (1,16±0,16), comparativamente ao grupo controle (1,5±0,34). No segundo momento, obtiveram-se resultados semelhantes, em que a expressão de MMP-9 no epitélio das córneas tratadas (1,16±0,3) foi menor, comparativamente às do grupo controle (1,5±0,22). entretanto, os valores não apresentaram diferença estatística (p=0,69) (Figura 16).

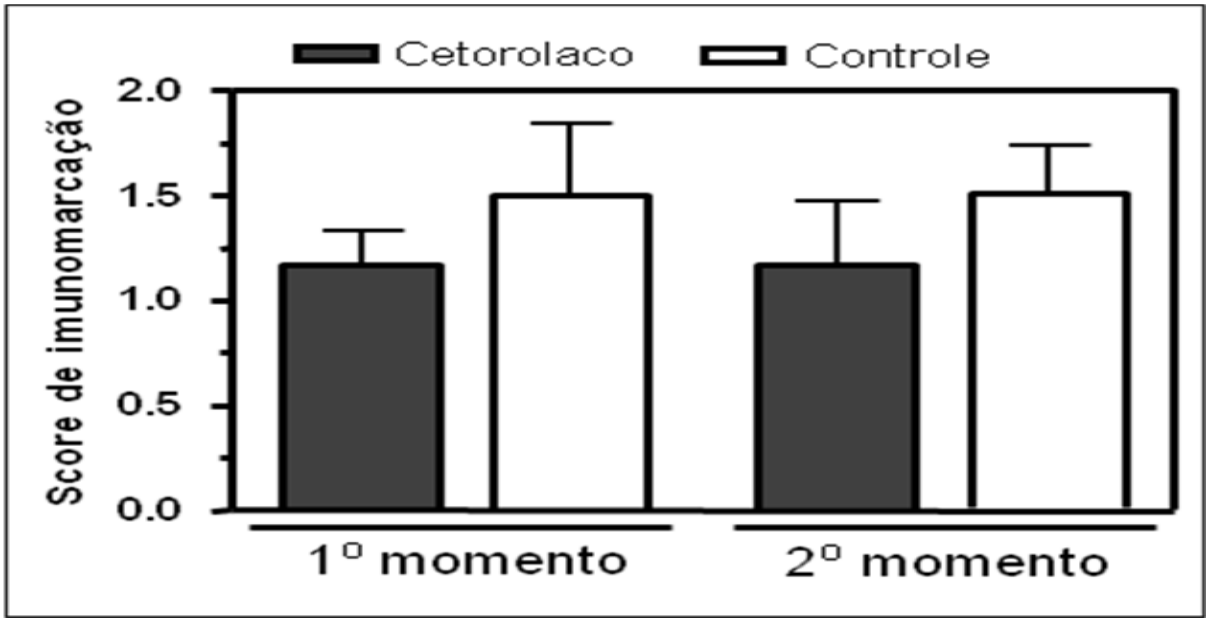


Figura 16. Escore de imunomarcação e erro padrão* da MMP-9 no epitélio das córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução salina à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.
***Análise de Variância para medidas Repetidas (p=0,69)**

Relativamente à imunomarcação da MMP-9 nas células do estroma, observou-se, às 24 horas, menor expressão no grupo tratado (31±10,14), comparativamente ao grupo controle (50±16,02). No segundo momento, verificou-se maior expressão no grupo tratado (32±17,53), comparativamente ao grupo controle (24,5±8,12). Os valores, entretanto, não foram comparativamente significativos (p=0,55) (Figura 17).

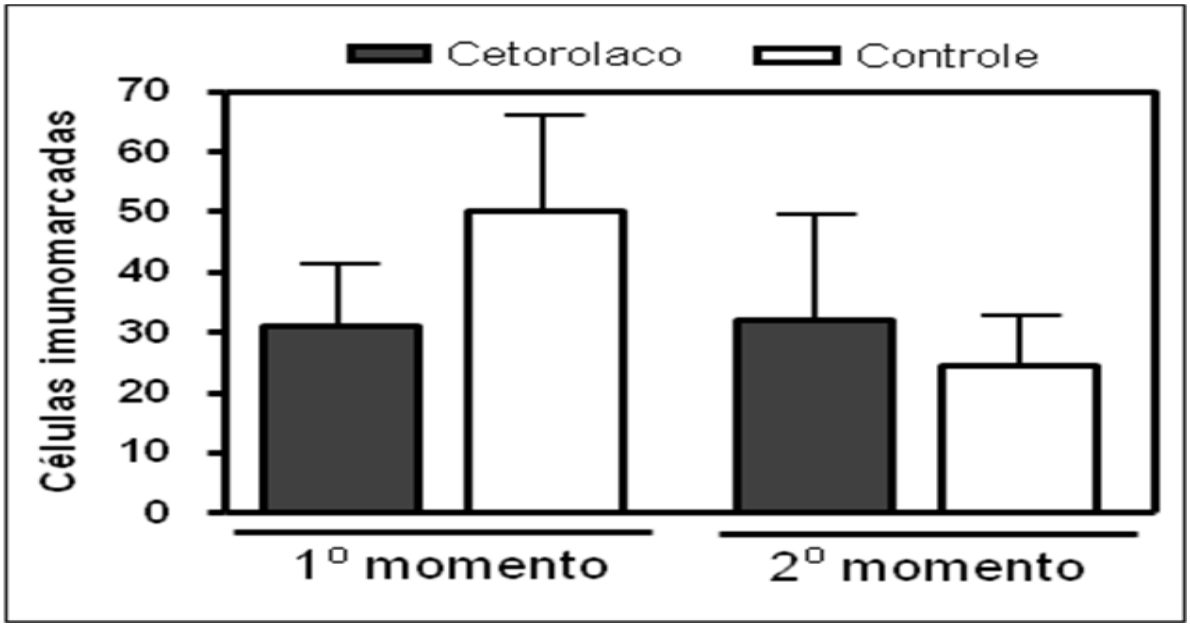


Figura 17. Média e erro padrão* do quantitativo de imunomarcação da MMP-9 em células estromais de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução salina à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.

***Análise de Variância para Medidas Repetidas (p=0,55)**

Relativamente à expressão de MMP-9, a média do quantitativo de células imunomarcadas às 24 horas foi menor na periferia das córneas tratadas (7±1,98), comparativamente às controles (23,5±7,34). No mesmo período, na região central verificaram-se valores discretamente inferiores para o grupo tratado (24±9,45), comparativamente ao controle (26,5±8,92). À epitelização, a média de células imunomarcadas na periferia dos grupos tratado (9,16±4,24) e controle (9±3,97) não divergiu. Na área central, todavia, verificou-se maior expressão no grupo tratado (22,83±13,41), comparativamente ao grupo controle (15,5±6,52). Não se observaram diferenças significativas ao compararem-se tais variáveis (p=0,32) (Figura 18).

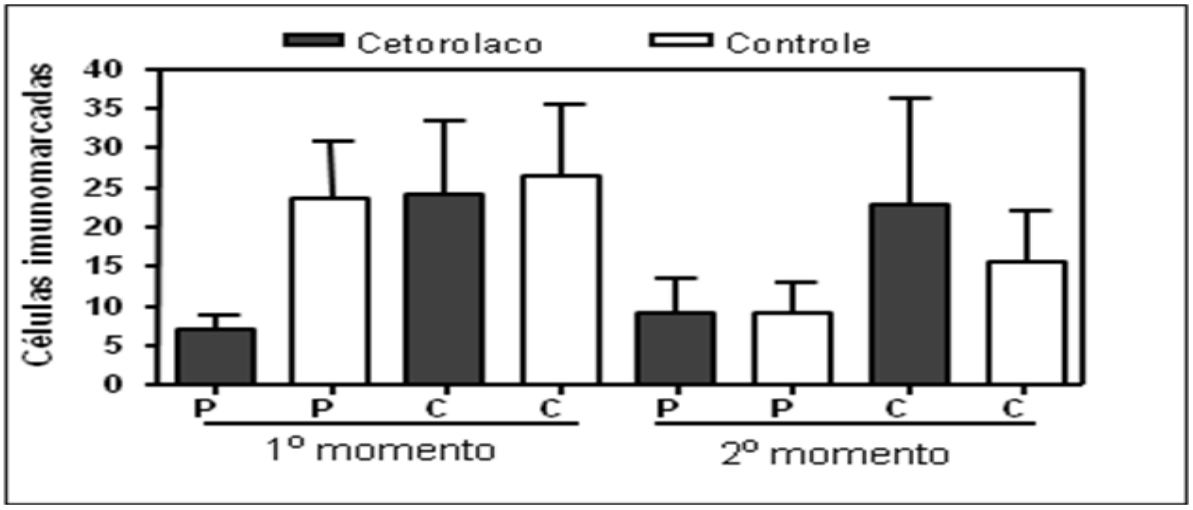


Figura 18. Média e erro padrão* do quantitativo de imunomarcação da MMP-9 em células estromais na periferia (P) e no centro (C) de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (cinza), ou com solução salina à 0,9% (branco), às 24 horas (primeiro momento) e às 55 horas (segundo momento) do início das lesões. Jaboticabal, SP, 2013.

***Análise de Variância para Medidas Repetidas (p=0,32)**

Não se observou correlação entre as expressões da iNOS e da MMP-9 no estroma dos grupos tratado (r=-0,20 e p=0,54) (FIGURA19A) e controle (r=-0,41 e p=0,18) (FIGURA 19B) e no epitélio do grupo tratado (r=0,30 e p=0,34) (Figura 19C). Todavia, observou-se moderada correlação (r=0,70 e p=0,01) entre as expressões da iNOS e MMP-9 no epitélio do grupo controle (Figura 19D).

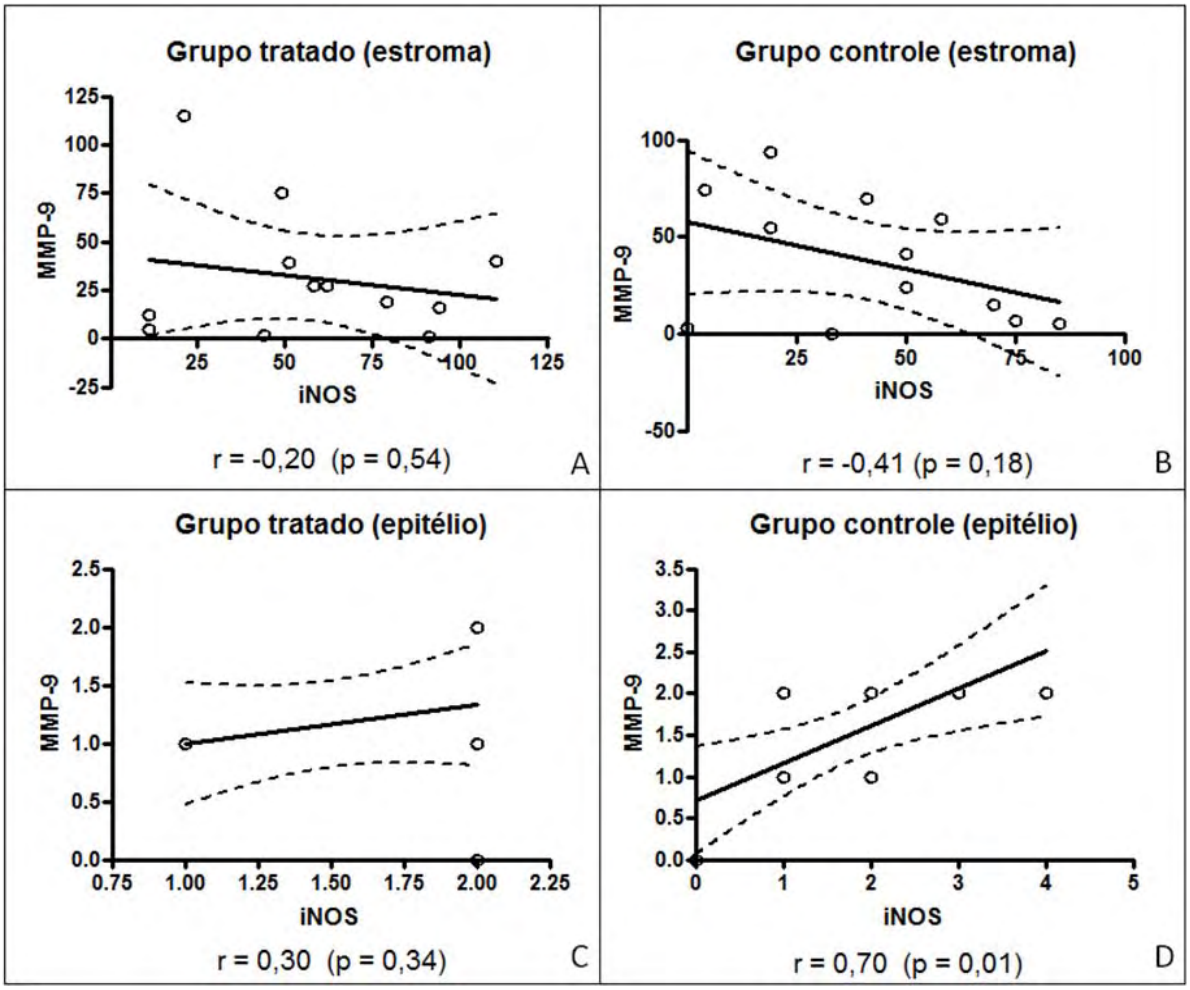


Figura 19. Curvas de regressão linear* entre o quantitativo de imunomarcação da iNOS e da MMP-9, em células estromais (A e B) e do epitélio (C e D) de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (A e C), ou com solução salina à 0,9% (B e D). Jaboticabal, SP, 2013.

***Teste de Pearson**

Não se observou correlação entre a expressão da iNOS e o quantitativo de células inflamatórias no estroma no grupo tratado (r=0,28 e p=0,38) e controle (r=-0,56 e p=0,06) (Figura 20).

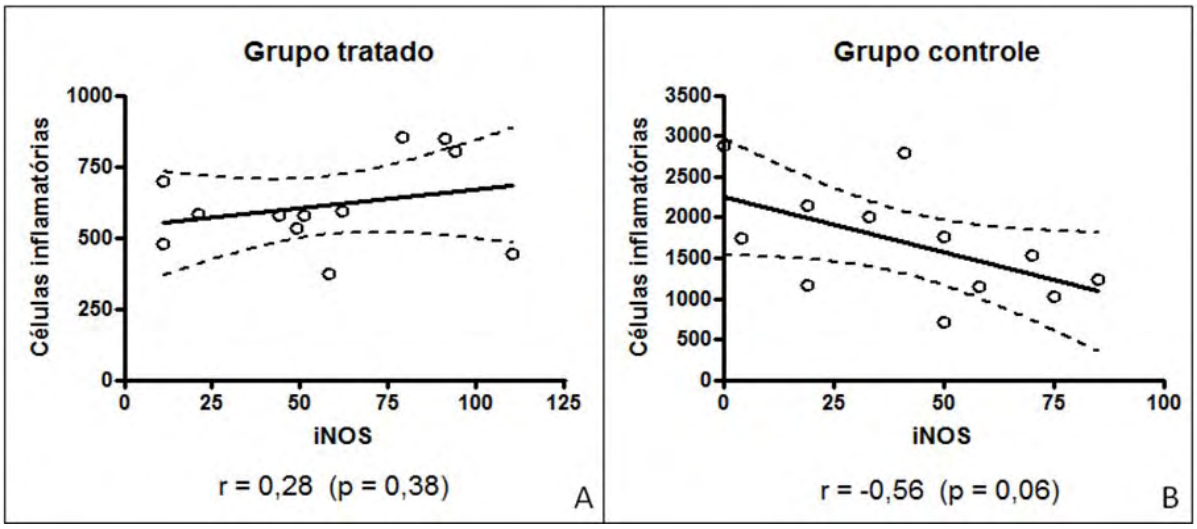


Figura 20. Curvas de regressão linear* entre o quantitativo de imunomarcação da iNOS e das células inflamatórias, em estroma de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, após abrasão química com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, tratadas com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante (A), ou com solução salina à 0,9% (B). Jaboticabal, SP, 2013.

***Teste de Pearson**

5. DISCUSSÃO

Os bons resultados alcançados com o cetorolaco de trometamina em olhos acometidos por uveíte, ceratites ulcerativas, conjuntivite alérgica, degeneração macular e no pós-operatório de cirurgias refrativas, da facoemulsificação e no da correção do estrabismo (WHATERBURY e FACH, 2006; TRATTLER e MCDONALD, 2007; SCHECHTER, 2008) e do controle da dor em córneas ulceradas quimicamente (RIBEIRO et al., 2010), motivaram estudarem-se os efeitos do fármaco, a uma concentração de 0,5%, sem conservante, em córneas de coelhos ulceradas pelo hidróxido de sódio 1 mol/L.

Constatou-se, na maioria dos períodos estudados, redução dos parâmetros qualitativos (blefarospasmo e hiperemia conjuntival), em olhos tratados com cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante. A maior manifestação do blefarospasmo foi observada 12 horas após o início das lesões, no grupo controle. A ausência de blefarospasmo, decorridas 24 horas do início das lesões, no grupo tratado, pode ter decorrido do efeito analgésico da substância.

A hiperemia conjuntival, no grupo tratado, manteve-se em níveis discretos, porem não se atribui esta manifestação ao desconforto ensejado pelas úlceras. Pela natureza vascularizada da conjuntiva e por sua alta capacidade em sintetizar cicloxigenases e metabólitos do ácido araquidônico (RADI & RENDER, 2008), reconhece-se a ação inibitória do cetorolaco de trometamina, reduzindo significativamente a intensidade de manifestação quer do blefarospasmo, quer da hiperemia conjuntival, comparativamente ao grupo controle.

Em razão da natureza lipofílica do epitélio corneal, a maioria dos fármacos lipofílicos penetra as camadas da córnea através da rota intracelular. Fármacos hidrofílicos, por sua vez, valem-se da rota paracelular (SCHOENWALD, 1997). O tecido corneal é capaz de acumular substâncias como a pilocarpina e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Assim, repetidas doses podem ofertar efeito cumulativo (SCHOENWALD, 1997). Os efeitos da instilação do cetorolaco de trometamina a cada 6 horas até a epitelização pode ter contribuído para os resultados encontrados.

Soluções oftálmicas, em sua maioria, são dotadas de conservantes, que são introduzidos para prevenir a replicação de contaminantes que diminuem a meia vida dos agentes e suscitam infecções secundárias (NOECKER, 2001). A toxicidade de fármacos tem sido associada à presença de preservativos em altas concentrações (BURSTEIN, 1980; BAUDOUIN et al., 1996). É comum que estudos em oftalmologia reportem efeitos tóxicos associados ao uso prolongado de fármacos oftálmicos (EPSTEIN et al., 2009). Na presente pesquisa, utilizou-se a formulação comercial, sem cloreto de benzalcônio (conservante), o qual apresenta propriedade epiteliotóxica (GUO et al., 2007; EPSTEIN et al., 2009). Preservativos, como o cloreto de belzalcônio, na córnea, enseja perda aguda de adenosina trifosfato, com concomitante defosforilação da miosina de cadeia leve, necessária à contração da actina do citoesqueleto. Esta é responsável pela manutenção da integridade da barreira epitelial e pela adesão e migração das células epiteliais (GUO et al., 2007) comprometendo os critérios de avaliação. Dessa forma, também optou-se por não se utilizarem os antibióticos para se evitarem possíveis efeitos epiteliotóxicos, notadamente das quinolonas e dos aminoglicosídeos (CHO et al., 1990; HENDRIX et al., 2001; McDERMON e WHEATER, 2006).

O protocolo empregado para confecção das úlceras corneais mostrou-se factível em 100% dos casos, 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., 2003).

A média do diâmetro da área ulcerada manteve-se maior nas córneas do grupo tratado, comparativamente ao controle. Após a abrasão química, as córneas controle epitelizaram-se significativamente mais rápido. Tais dados sugerem que a substância, mesmo sem conservante, é epiteliotóxica por provável alteração em seu citoesqueleto (AGRAWAL e TSAI, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro et al. (2010), que visibilizaram descamação e diminuição das microvilosidades em córneas tratadas com cetorolaco de trometamina.

No presente estudo, o tempo de epitelização nas córneas controles corrobora com os achados obtidos em outra investigação realizada em coelhos com úlceras de 0,65 mm de diâmetro (MATSUDA et al., 1985). Resultados similares, também foram obtidos por Ribeiro et al. (2010) relativamente ao tempo de epitelização das córneas tratadas.

A epitelização corneal passa por três fases distintas. Na primeira, hemidesmossomos são perdidos, formando-se adesão provisória, denominada contato focal. Durante essa fase, células epiteliais se achatam e migram como um folheto intacto para cobrir a área desnuda. Na segunda fase, células distais à margem ulcerada se proliferam, aproximadamente 5 horas após a injúria, a uma velocidade média de 60-80 µm/hora, repovoando a área desnuda. Tem-se o início da estratificação e da diferenciação celulares. Na terceira, hemidesmossomos e matriz extracelular são reconstituídos (AGRAWAL e TSAI, 2003).

Pereira et al. (2001) estudaram, em coelhos, os efeitos do cetorolaco de trometamina e do seu conservante sobre a epitelização de córneas desbridadas mecanicamente, após queimadura por álcool etílico à 95%. Resultados semelhantes aos da presente pesquisa foram reportados. Olhos tratados com o AINE ainda se

apresentavam ulcerados, decorridas 60 horas das abrasões, diferentemente dos controles e daqueles tratados com o conservante (cloreto de benzalcônio à 0,01% e associações). Na presente pesquisa, todavia, os olhos tratados apresentaram-se epitelizados 55 horas após as abrasões. O maior diâmetro das lesões produzidas por Pereira et al. (2001) (7,5 mm) pode estar relacionado ao maior tempo de epitelização observado por esses autores. Embora Pereira et al. (2001) não tenham observado retardo na epitelização das córneas tratadas com conservante.

No presente estudo, a exsudação inflamatória foi significativamente menor nos olhos tratados. Achados similares foram descritos após o uso do cetorolaco de trometamina, com conservante, em úlceras experimentais em coelhos. A inibição da infiltração leucocitária ensejada pelo cetorolaco de trometamina parece atuar sobre a epitelização corneal (PEREIRA et al., 2001). A infiltração de polimorfonucleares é necessária para epitelização, notadamente neutrófilos que secretem fatores de crescimento (trefonas) capazes de estimular a fibroplastia. O infiltrado inflamatório influencia as células residentes, através da produção de citocinas que modulam a reparação tecidual (GAN et al., 1999). Após lesão corneal, a migração de neutrófilos para o estroma ocorre em dois momentos. O primeiro é dependente de moléculas de adesão (P e E-selectina) e de CD18, e o segundo, apenas de moléculas de adesão, indicando que a migração precoce de leucócitos promove epitelização (LI et al., 2006).

O número de células inflamatórias foi maior na periferia das córneas controles, o que contribuiu para a diferença estatística observada, dado que o número de células na região central não diferiu significativamente entre os grupos. Estudos mostraram que o infiltrado celular em modelo de inflamação estéril é constituído, principalmente, por neutrófilos, monócitos e poucos macrófagos (SUNDERKOTTER et al., 1991; SENNLAUB et al., 1999), corroborando com os resultados do presente trabalho.

A reparação cicatricial é complexa e influenciada por proteínas e por 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 do 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 a substância exerce papel importante na reparação cicatricial (KAWAMURA et al., 2008). AINEs interferem na síntese de prostaglandinas pela inibição da via da cicloxigenase (VANE, 1971; VANE et al., 1998), com potencial efeito inibitório sobre a reparação cicatricial (HAWS et al., 1996). Avaliá-la poderia esclarecer as razões pelas quais o cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, retardou a epitelização.

Takahashi et al. (1993) reportaram que o colírio de diclofenaco sódico foi capaz de inibir o crescimento de culturas de epitélio conjuntival, por induzir a alterações na estrutura do citoesqueleto. O evento foi associado a baixos níveis de prostaglandina. Diclofenaco sódico e outros AINEs podem ensejar alterações metabólicas e morfológicas no epitélio e no estroma corneais (TAKAHASHI et al., 1993; LU et al., 1996), que podem justificar o atraso na epitelização dos olhos tratados.

Estudos experimentais demonstraram que o diclofenaco sódico e o cetorolaco diminuem a sensibilidade corneal por inibirem a síntese de prostaglandinas (SUN e GIMBEL, 1997). A hipoestesia pode estar relacionada ao bloqueio dos canais iônicos nas terminações nervosas, com diminuição do influxo sensorial das fibras nervosas nociceptoras da córnea para o sistema nervoso central (CHEN et al., 1997). O uso prolongado de colírios à base de AINEs pode provocar efeitos adversos, resultado da epiteliopatia neurotrófica e do aumento do tempo de epitelização (LU et al., 1996; ARAGONA et al., 2000), o que pode ter sido a causa do retardo na epitelização na presente pesquisa.

Embora, ao término das avaliações, ambos os grupos tivessem evoluído para epitelização, admite-se que uma eventual 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. Aos 7 dias após a lesão, 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 (YEW et al., 2000). Demonstrou-se que, após abrasão química, mesmo epitelizadas, córneas de cobaias não apresentam a membrana basal em

condições ideais, devido à expressão descontínua de laminina e do colágeno tipo IV sob o epitélio recém formado (SAIKA et al., 1995). Na presente pesquisa, as avaliações findaram-se por volta de 55 horas após a confecção das úlceras, períodos mais longos de avaliação poderiam demonstrar ulcerações recorrentes no grupo tratado, por terem apresentado maior área ulcerada e por evidências do fármaco ser epiteliotóxico (RIBEIRO et al., 2010).

A detecção do NO em amostras biológicas representa um desafio, em função da mínima concentração e da meia-vida extremamente curta deste composto, que é de cerca de 4 a 6 segundos no plasma e de 10 a 60 segundos nos tecidos (ARCHERS, 1993; KIECHLE e MARLINSKI, 1993). Métodos em técnica avançada têm sido propostos na literatura (DUSSE et al., 2003). Optou-se pela determinação indireta, valendo-se da quantificação imunoistoquímica da iNOS, dadas as injunções da pesquisa.

Publicou-se que a iNOS é expressada no curso da inflamação após abrasão química por álcali em córneas de ratos (SENNLAUB et al., 1999). A expressão foi máxima entre 4 e 7 dias após a cauterização, correspondendo a maior severidade da doença. Na presente pesquisa, observou-se a presença da iNOS na área central da córnea, corroborando com os resultados encontrados por Sennlaub et al. (1999), e que um número máximo de células iNOS positivas se deu às 55 horas após as abrasões. Apesar do quantitativo de células inflamatórias se concentrarem na região periférica no primeiro momento, maior imunomarcação da iNOS foi encontrada na região central, o que pode estar relacionado a um complexo mecanismos de sinalização da MEC nessa região, nesse estágio da reparação tecidual, assim como outras células podem estar envolvidas na sua síntese, que não apenas macrófagos e neutrófilos.

Sennlaub et al. (1999) realizaram imunomarcação para neutrófilos demonstrando perfil semelhante ao encontrado para iNOS em cortes adjacentes, entretanto poucas células exibiram marcação positiva para macrófagos maduros. Tais resultados sugerem que os neutrófilos ou monócitos podem ser as principais fontes de NO na córnea, segundo o modelo. Valendo-se do mesmo modelo de abrasão química, e considerando o tipo de infiltrado inflamatório encontrado na presente pesquisa, é possível sugerir que as mesmas células estejam envolvidas na

expressão da iNOS, embora imunoistoquímica para identificação de subtipos de células específicas deva ser realizada para confirmação. Entretanto, na presente pesquisa não se encontrou correlação entre a expressão da iNOS e o quantitativo de células inflamatórias. Células de Langerhans também já foram observadas no epitélio central após cauterização térmica (WILLIAMSON et al., 1987) e podem participar da produção de NO.

Observou-se imunomarcação da iNOS em ceratócitos nas áreas adjacentes às lesões. Dighiero et al. (1997) demonstraram que a iNOS também pode ser expressada *in vitro*, em ceratócitos, após estimulação por citocinas. Não se pode excluir a possibilidade de que tais células possam também contribuir para produção *in vivo* de NO. Não obstante, as reações que ocorrem durante a reparação corneal são de natureza mais complexa, comparativamente às reações ocorridas *in vitro* por estimulações específicas (SENNLAUB et al., 1999).

O NO produzido pela iNOS pode interferir na angiogênese corneal durante cauterização química (SENNLAUB et al., 1999), justificando o maior tempo de epitelização no grupo tratado com cetorolaco de trometamina. A expressão da iNOS foi maior neste grupo, comparativamente ao controle, a despeito da inexistência de diferenças significativas. Resultados contrários foram divulgados por ZICHE et al. (1994) e ZICHE et al. (1997), que demonstraram o papel pró-angiogênico da NO *in vitro*. Tais diferenças podem estar relacionadas à expressão de isoformas distintas de NOS entre os modelos, dado o uso de inibidores não específicos. O mecanismo pelo qual o NO inibe a angiogênese durante a cauterização corneal ainda é desconhecido, todavia, admite-se que o NO produzido pela iNOS diminua o quantitativo de células inflamatórias por induzir a apoptose (SARIH et al., 1993; YOSHINOBU et al., 1997), o que justificaria a expressão da iNOS no grupo tratado e sua não correlação com o quantitativo de células inflamatórias. Sabe-se que os AINEs, ao inibirem a exsudação inflamatória, diminuem a neovascularização, na qual a iNOS pode ter importante papel. Recentemente, verificou-se o envolvimento de outras isoformas do NOS, exceto a iNOS, na indução da vascularização (CHEN et al., 2011b). Tais dados explicariam a expressão da iNOS no grupo tratado e a não correlação entre sua expressão e o quantitativo de células inflamatórias.

Escassos são os trabalhos que demonstram expressão da iNOS a partir do epitélio. Kim et al. (2002) mostraram imunomarcação da iNOS após ceratoplastia superficial a laser. CHEN et al. (2011a) também observaram imunomarcação para iNOS em epitélio após estimulação por radiação ultravioleta. O papel da iNOS no epitélio corneal ainda não foi esclarecido e está sob investigação. Em nosso modelo, houve expressão da iNOS em padrão semelhante em ambos os grupos, apesar da ação epiteliotóxica da droga testada.

A MMP-9, no modelo de abrasão química adotado, mostrou imunomarcação em região epitelial adjacente à área da lesão, corroborando com os achados de Ye e Azar (1998). Estes estabeleceram que células epiteliais basais são responsáveis pela síntese de MMP-9, em córneas lesadas por ceratectomia. Por vezes, foram encontradas células do infiltrado inflamatório e ceratócitos positivos para MMP-9, não reportado por Ye a Azar (1998). Outros estudos demonstraram que a MMP-2 e a MMP-9 são produzidas por células corneais residentes (FINI et al., 1992; FINI et al., 1996) e têm papel importante em estágios iniciais da reparação corneal e na remodelação da matriz extracelular (YE e AZAR, 1998).

Avaliou-se a expressão de MMP-9 às 18, 24 e 56 horas após a lesão (YE e AZAR; 1998). Admite-se que a mesma está envolvida em estágios precoces da reparação do epitélio corneal e que a MMP-2 pode ser importante em estágios tardios da remodelação da Matriz extracelular (MEC) (MATSUBARA et al., 1991; AZAR et al., 1996). Na presente pesquisa, houve expressão de MMP-9 no epitélio, no primeiro e segundo momentos. Quando foram avaliadas células estromais, observou-se maior expressão na região central das córneas às 24 horas das abrasões. A maior atividade da MMP-9, encontrada às 24 horas, corrobora com achados de Ye e Azar (1998).

Na lesão e na inflamação corneais, a expressão de MMPs exerce papel significante sobre a proteólise e a cicatrização corneais. Entretanto, em situações patológicas, a alta produção de MMPs pode levar a queratólise ulcerativa (O'BRIEN et al., 2001). A desregulação de MMPs, com o uso local de AINEs, pode retardar a reparação do epitélio corneal (O'BRIEN et al., 2001). Reportou-se que a indometacina pode aumentar a expressão de colagenases, embora sem inibir a biossíntese da MEC (SALVATORI et al., 1992; DINGE, 1996). Colagenases podem

prejudicar a reparação cicatricial rompendo as interações de células epiteliais e a membrana basal. Encontrou-se produção de MMPs no epitélio corneal íntegro que recebeu AINEs (REVIGLIO et al., 2003), reforçando a hipótese da sua participação e no agravamento de úlceras corneais. Tais achados podem ser de significação clínica na fisiopatologia da queratólise ulcerativa associada ao uso local de AINEs, (FLACH, 2000; LIN et al., 2000; O'BRIEN et al., 2001; REVIGLIO et al, 2003).

Reviglio et al. (2003) reportaram retardo no processo de reparação corneal associado ao tratamento local com AINEs e expressão de altos níveis de MMP-1, MMP-8 e MMP-2. Estas últimas, que não foram avaliadas na presente pesquisa, podem ofertar dados mais consistentes, quanto aos eventos associados ao retardo da epitelização no grupo tratado com cetorolaco de trometamina.

Reviglio et al. (2003) demonstraram baixos níveis de MMP-9 em córneas tratadas com cetorolaco, ainda sim, maiores, comparativamente ao grupo controle. Na presente pesquisa, o resultado é controverso, uma vez que se observou expressão menor de MMP-9 (não significativo) no epitélio do grupo tratado, comparativamente ao controle. Em ambas as pesquisas, contudo, não houve diferenças significativas. Devido à epiteliotoxicidade do cetorolaco de trometamina, esperava-se maior expressão da gelatinase no epitélio do grupo tratado, mas tal não foi constatado. Entretanto, o método de detecção adotado expressa as formas ativa e latente da MMP-9. Métodos, como a zimografia, mostram bandas que diferenciam as formas das enzimas em atividade e novos métodos vêm sendo testados com boa sensibilidade e especificidade (KAUFMAN, 2013). Uma pesquisa (RIBEIRO et. al., 2012) mostrou que não houve diferença significativa na expressão de MMPs por imunoistoquímica, entretanto, quando se utilizou a zimografia, observaram-se diferenças no quantitativo de MMP-9 e MMP-2.

Inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) são produzidos em conjunto com as MMPs. Eles regulam MMPs por interferir com a enzima MMP ativa e a ativação da pró-enzima MMP (KLEINER e ESTETLER-STEVENSON, 1993). Quatro tipos de TIMPs foram identificadas: TIMP-1, -2, -3 e -4 (POULSOM et al., 1993; BORD et al., 1997; POWE et al., 1997; FREESTONE et al., 1997). Todas inibem MMPs, mas com diferentes afinidades. TIMP-1 mostra alta afinidade por gelatinase B (MMP-9) e a TIMP-2 está geralmente vinculada à gelatinase A (MMP-2) (BROOKS e OLLIVER,

2004). Avaliação da expressão das TIMPs poderia auxiliar no entendimento da não significância da expressão de MMP-9 no grupo tratado com cetorolaco de trometamina.

Em processos inflamatórios, demonstrou-se que o NO ou o peroxinitrito podem alterar os níveis de MMP e de TIMP (RAJAGOPALAN et al., 1996; OKAMOTO et al., 1997; HIRAI et al., 2001). Em contrapartida, na presente pesquisa, não se encontrou correlação entre a expressão da MMP-9 e da iNOS. Trabalhos citam o envolvimento do estresse oxidativo em processos inflamatórios, no qual macrófagos, polimorfonucleares e outras células inflamatórias estão envolvidas na ativação de enzimas degradativas (BROWN et al., 2004). Altas concentrações de peroxinitrito, *in vitro*, diminuíram a TIMP-1 e, consequentemente, a inibição da MMP-2 (FREARS et. al., 1996). Resultado similar foi encontrado por BROWN et al. (2004). Entretanto, a atividade das gelatinases permaneceu a mesma, fazendo crer que o peroxinitrito ensejou a perda da função das gelatinases. Os resultados refletem a resposta celular ao estresse oxidativo induzido pelo peroxinitrito, sugerindo haver relação entre elementos do estresse oxidativo com a atividade de enzimas degradativas em fibroblastos corneais. Admite-se que outras MMPs possam ser ativadas e estarem envolvidas nestas reações, assim como uma maior atividade das TIMPs. Estudos complementares da expressão de outras gelatinases e seus inibidores forneceriam dados importantes para a elucidação das hipóteses.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, guardadas as injunções do meio e as em que a pesquisa fora concebida, admite-se que o cetorolaco de trometamina à 0,5%, sem conservante, ensejou menor desconforto local e induziu a uma menor exsudação inflamatória, retardando a epitelização, outrossim, a alterações não significativas na expressão da iNOS e da MMP-9, em córneas de coelhos ulceradas com hidróxido de sódio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERTI, M. M.; BOUAT, C. G.; ALLAIRE, C. M.; TRINQUAND, C. J. Combined endomethacin/gentamicin eye drops to reduce pain after traumatic corneal abrasion. **European Journal of Ophthalmology**, Milan, 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**, London, v. 14, pt. 2, p. 206-210, 2000.

ARCHERS, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, n. 2, p. 349-60, 1993.

AZAR, D. T.; HAHN, T. W.; JAIN, S.; YEH, Y. C.; STETLER-STEVENSON, S. W. Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. **Cornea**, Philadelphia, v. 15, n. 1, p. 18-24, 1996.

BAUDOUIN, C. Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface. **Current Opinion in Ophthalmology**, Philadelphia, v. 7, n. 2, p. 80-86, 1996.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 271, n. 15, pt. 1, p. 1424-1437, 1996.

BECQUET, F.; COURTOIS, Y.; GOUREAU, O. Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. **Survey of Ophthalmology**, Philadelphia, v. 42, n. 1, p. 71-82, 1997.

BECQUET, F.; GOLDSCHILD, M.; MOLDOVAN, M. S.; ETTAICHE, M.; GASTAUD, P.; BAUDOUIN C. Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface. **Current Eye Research**, London, v. 17, n. 4, p. 419-425, 1998.

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

BORD, S.; HORNER, A.; HEMBRY, R. M.; REYNOLDS, J. J.; COMPSTON, J. E. Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. **Journal of Anatomy**, London, v. 191, p. 39-48, 1997.

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

BROWN, D. J.; LIN, B.; CHWA, M.; ATILANO, S. R.; KIM, D. W.; KENNEY, M. C. Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 10, p. 281-288, 2004.

BRUNELLI, A. T. J.; CAMPOS, C. F.; TALIERI, I. C.; VICENTI, F. A. M.; MORAES, J. R.; LAUS, J. L. Topical effects of autogenous, allogenous and xenogenous blood serum on the healing of alkali burns in the cornea of dogs. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 10, n. 1, p. 49-54, 2003.

BRUNELLI, A. T. J. Ceratite ulcerativa provocada por álcali em cães. **Revista de Ciências Veterinárias**, Leme, v. 1, n. 1, p. 8-10, 2003.

BUDDI, R.; LIN, B.; ATILANO, S. R.; ZORAPAPEL, N. C.; KENNEY, M. C.; BROWN, D. J. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 50, n. 3, p. 341-351, 2002.

BURSTEIN, N. L. Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. **Survey Ophthalmology**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 15-30, 1980.

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 Journ al of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 36-44, 2003.

CHEN, B. Y.; LIN, D. P. C.; WU, C. Y.; TENG, M. C.; SUN, C. Y.; TSAI, Y. T.; SU, K. C.; CHANG, H. H. Dietary zerumbone prevents mouse cornea from UVB-induced photokeratitis through inhibition of NF-κB, iNOS, and TNF-α expression and reduction of MDA accumulation. **Molecular Vision**, Atlanta, v. 17, p. 854-863, 2011a.

CHEN, X.; GALLAR, J.; BELMONTE, C. Reduction by antiinflammatory drugs of the response of corneal sensory nerve fibers to chemical irritation. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, Rockville, v. 38, n. 10, p. 1944-1953, 1997.

CHEN, Y.; LIU, G. Q.; LU, P. R. Potential involvement of nitric oxide synthase but not inducible nitric oxide synthase in the development of experimental corneal neovascularization. **International Journal of Ophthalmology**, China, v. 4, n. 4, p. 343-348, 2011b.

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

CHRISTOPHERSON, K. S.; BREDT, D. S. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and diseases. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 100, n. 10, p. 2424-2429, 1997.

DIGHIERO, P.; BEHAR-COHEN, F.; COURTOIS, Y.; GOUREAU, O. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Bovine Corneal Endothelial Cells and Keratocytes In Vitro After Lipopolysaccharide and Cytokines Stimulation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v. 38, n. 10, p. 2045-2052, 1997.

DINGE, J. T. The effect of NSAID on human articular cartilage glycosaminoglycan synthesis. **European Journal of Rheumatology and Inflammation**, London, v. 16, p. 47–52, 1996.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

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**, New Rochelle, v. 25, n. 2, p. 113-119, 2009.

FANG, F. C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **Journal of Clinical Investigation***,* New York*,* v. 99, p. 2818-2825, 1997.

FINI, M. E.; GIRARD, M. T.; MATSUBARA, M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. **Ada Ophthalmolgists**, v. 202, p. 26-33, 1992.

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

FLACH, A. Topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drugs and corneal problems: an interim review and comment. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 107, p. 1224-1226, 2000.

FREARS, E. R.; ZHANG, Z.; BLAKE, D. R.; O'CONNELL, J. P.; WINYARD, P. G. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 381, p. 21-4, 1996.

FREESTONE, T.; TURNER, R.J.; HIGMAN, D.J.; LEVER, M.J.; POWELL, J.T. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. **FEBS Letters**, Alberta, v. 401, p. 213-217, 1997.

GALERA, P. D.; LAUS, J. L.; ORIÁ, A. P. Afecções da túnica fibrosa. In: LAUS J.L. **Oftalmologia clínica e cirúrgica em cães e em gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 69-96.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; KIM, H. Effect of Leukocytes on Corneal Cellular Proliferation and Wound Healing. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, Rockville, v. 40, n. 3, p. 575-581, 1999.

GARRANA, R. M. R.; ZIESKE, J. D.; ASSOULINE, M.; GIPSON, I. K. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, Rockville, v. 40, p. 1266-1270, 1999.

GASSET, A. R.; ISHII, Y.; KAUFMAN, H. E.; MILLER, T. Cytotoxicity of ophthalmic preservatives. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 78, p. 98-105, 1974.

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

GOMES, D. A. S. **Efeito do L-Name na expressão de iNOS, MPO e na perda óssea alveolar em ratos diabéticos com periodontite experimental**. 2009. 105 f. Tese (Doutor em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

GOUREAU, O.; BELLOT, J.; THILLAYE, B.; COURTOIS, Y.; DE KOZAK, Y. Increased nitric oxide production in endotoxininduced uveitis. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 154, p. 6518-6523, 1995.

GOUREAU, O.; HICKS, D.; COURTOIS, Y. Human retinal pigmented epithelial cells produce nitric oxide in response to cytokines. **Biochemical and Biophysical Research Communication***,* Philadelphia, v. 198, p. 120-126, 1994.

GOUREAU, O.; LEPOIVRE, M.; COURTOIS, Y. Lipopolysaccharide and cytokines induce a macrophage-type of nitric oxide synthase in bovine retinal pigmented epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication***,* Philadelphia, v. 186, p. 854-859. 1992.

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**, Rockville, v. 48, p. 2001-2008, 2007.

HAWS, M.J.; KUCAN, J.O.; ROTH, A.C. et al. The effects of chronic ketorolac tromethamine (Toradol) on wound healing. **Annals of Plastic Surgery**, Philadelphia, v. 37, p. 147-151, 1996.

HE, J.; BAZAN, N. G.; BAZAN, H. E. Alkali-induced corneal stromal melting prevention by a novel platelet-activating factor receptor antagonist. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 124, p. 70-8, 2006.

HENDRIX, D. V. H.; WARD, D. A.; BARNHILL, M. A. Effects of anti-inflammatory drugs and preservatives on morphologic characteristics and migration of canine

corneal epithelial cells in tissue culture. **Veterinary Ophthalmology**, West Sussex, v. 5, p. 127-135, 2002.

HIRAI, Y.; MIGITA, K.; HONDA, S.; UEKI, Y.; YAMASAKI, S.; URAYAMA, S.; KAMACHI, M.; KAWAKAMI, A.; IDA, H.; KITA, M.; FUKUDA, T.; SHIBATOMI, K.; KAWABE, Y.; AOYAGI, T.; EGUCHI, K. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. **Life Sciences**, London, v. 68, p. 913-20, 2001.

JACQUEMIN, E.; DE KOZAK, Y.; THILLAYE, B.; COURTOIS, Y.; GOUREAU, O. Expression of inducible nitric oxide synthase in the eye from endotoxin-induced uveitis rats. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 37, p. 1187-1196, 1996.

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. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, New Rochelle, v. 21, n. 1, p. 36-43, 2005.

KAUFMAN, H. E. The practical detection of MMP-9 diagnoses ocular surface disease and may help prevent its complications. **Cornea**, Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 211-216, 2013.

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**, Philadelphia, v. 27, n. 10, p. 1156-1163, 2008.

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

KIECHLE, F. L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **American Journal of Clinic Pathology**, Birmingham, v. 100, p. 567-75, 1993.

KIM, J. C.; PARK, G. S.; KIM, J. K.; KIM, Y. M. The Role of Nitric Oxide in Ocular Surface Cells. **Journal of Korean Medical Science**, Seoul, v. 17, p. 389-394, 2002.

KITAOJI, H.; KITAOJI, S.; NAKAI, Y. [Diclofenac sodium ophthalmic solution before and after cataract surgery]. **Rinsho Ganka**, Tokyo, v. 45, p. 171-174, 1991.

KLEINER, D. J.; STETLER-STEVENSON, S. W. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 5, p. 891-897, 1993.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase in mammals. **Biochemistry Journal**, Beckenham, v. 298, p. 249-258. 1994.

LEEUW, A. M.; CHAN, K. Y. Corneal nerve regeneration. Correlation between morphology and restoration of sensitivity. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, Rockville, v. 30, n. 9, p. 1980-1990, 1989.

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

LIVERSIDGE, J.; GRABOWSKI, P.; RALSTON, S.; BENJAMIN, N.; FORRESTER, J. V. Rat retinal pigment epithelial cells express an inducible form of nitric oxide synthase and produce NO in response to inflammatory cytokines and activated T cells. **Immunology**, West Sussex, v. 83, p. 404-409, 1994.

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

LU, K. L.; WEE, W. R.; SAKAMOTO, T.; MCDONNELL, P. J. Comparison of in vitro antiproliferative effects of steroids and nonsteroidal antiinflammatory drugs on human keratocytes. **Cornea**, Philadelphia, v. 15, p. 185-190, 1996.

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

MACMICKING, J. D.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 323–350, 1997.

MANRIQUET, W. G. **Estudo comparativo da resposta inflamatória crônica induzida em Piaractus mesopotamicus e Oreochromis niloticus por corpo estranho e bacilo de Calmette-Guérin**. 2012. 93 f. Tese (Doutorado em [Medicina Veterinária - Área de concentração Patologia Animal]) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2012.

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

MATSUBARA, M.; ZIESKE, J. D.; FINI, M. E. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 32, p. 3221-3237, 1991.

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**, Philadelphia, v. 22, p. S22-S25, 2006.

MCMENAMIN, P. G.; CREWE, J. M. Cellular localisation and dynamics of nitric oxide synthase expression in the rat anterior segment during endotoxin-induced uveitis. **Experimental Eye Research**, London, v. 65, p. 157-64, 1997.

MIKKELSEN, R. B.; WARDMAN, P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. **Oncogene**, London, v. 22, p. 5734-5754, 2003.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; JOURD'HEUIL, D.; GRISHAM, M. B.; FUKUTO, J. M.; FEELISCH, M.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide, In: IGNARRO, L. J. **Nitric oxide**: biology and pathobiology. San Diego: Academic Press, 2000. p. 41-55.

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

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **Journal Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 100, p. 2417-2423, 1997.

NOECKER, R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. **Advances in Therrapy**, Aurora, v.18, p. 205–215, 2001.

O'BRIEN, T. P.; LI, Q. J.; SAUERBURGER, F.; REVIGLIO, V. E.; RANA, T. ASHRAF, M. F. The role of matrix metalloproteinases in ulcerative keratolysis associated with perioperative diclofenac use. **Ophthalmology**, Philadelphia, v. 108, p. 656–659, 2001.

OFFICE OF LABORATORY ANIMAL WELFARE. **Health Research Extension Act of 1985**. [S.l, 2002]. Disponível em: <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>. Acesso em: 04 fev. 2013.

OHSHIMA, H.; BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 305, p. 253-64, 1994.

OKAMOTO, T.; AKAIKE, T.; NAGANO, T.; MIYAJIMA, S.; SUGA, M.; ANDO, M.; ICHIMORI, K.; MAEDA, H. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Maryland Heights, v. 342, p. 261-74, 1997.

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

PAPAPETROPOULOS, A.; DESAI, K. M.; RUDIC, R. D.; MAYER, B.; ZHANG, R.; RUIZ-TORRES, M. P.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; MADRI, J. A.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 150, p. 1835-1844, 1997a.

PAPAPETROPOULOS, A.; GARCIA–CARDENA, G.; MADRI, J. A.; SESSA, W. C. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 100, p. 3131-3139, 1997b.

PARENTI, A.; MORBIDELLI, L.; CUI, X. L.; DOUGLAS, J. G.; HOOD, J. D.; GRANGER, H. J.; LEDDA, F.; ZICHE, M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, p. 4220-4226, 1998.

PEREIRA, A. E.; SILVA, M. R. B. M.; FRÓES, R. C. C.; MARQUES, M. A. Regeneração do epitélio corneano com uso tópico de cetorolac de trometamina. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 60, p. 695-701, 2001.

PORASUPHATANA, S.; TSAI, P.; ROSEN, G. M. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Pharmacology & Toxicology**, Philadelphia, v. 134, p. 281-289, 2003.

POULSOM, R.; HANBY, A.M.; PIGNATELLI, M.; JEFFERY, R.E.; LONGCROFT, J.M.; ROGERS, L.; STAMP, G.W.. Expression of gelatinase A and T1MP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 46, p. 429-436, 1993.

POWE, D.G.; BROUGH, J.L.; CARTER, G.I.; BAILEY, E.M.; STETLER-STEVENSON, W.G.; TURNER, D.R.; HEWITT, R.E. TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. **British Journal of Cancer**, Nottingham v. 75, p. l678-l683, 1997.

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

RAJAGOPALAN, S.; MENG, X. P.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D. G.; GALIS, Z. S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 98, p. 2572-2579, 1996.

REVIGLIO, V. E.; RANA, T. S.; LI, Q. J.; ASHRAF, M. F., DALY, M. K.; O´BRIEN, T. P. Effects of topical nonsteroidal antinflammatory drugs on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, Philadelphia, v. 29, p. 989-997, 2003.

RIBEIRO, A. P.; CONCEIÇÃO, L. F.; SILVA, M. L.; PADUA, I. R. M.; ANDRADE, A.L.; LUVIZOTTO, M. C. R. Effects of preservative free 0.5% ketorolac tromethamine in alkali burned rabbit corneas. **Veterinary Ophthalmology**, West Sussex, v. 13, n. 5, p. 360, 2010.

RIBEIRO, A. P.; SILVA, M. L.; ARAÚJO, R. L.; FERRUCCI, D. L.; MINEO, T.; THIESEN, R.; BANDARRA, M. B.; LAUS, J. L. Expression of matrix metalloproteinases, type IV collagen, and interleukin-10 in rabbits treated with morphine after lamellar keratectomy. **Veterinary Ophthalmology**, West Sussex, v. 15, n. 3, p. 153-163, 2012.

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 Research**, Basel, v. 27, n. 3, p. 129-135, 1995.

SALVATORI, R.; GUIDON, P. T. J.; PAPUANO, B.E.; BOCKMAN, R.S. Prostaglandin E1 inhibits collagenase gene expression in rabbit synoviocytes and human fibroblasts. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 131, p. 21-28, 1992.

SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V.; ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, v. 191, p. 503–508, 1993.

SCHECHTER, B. A. Ketorolac tromethamine 0.4% as a treatment for allergic conjuctivitis. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, London, v. 4, n. 4, p.507-511, 2008.

SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F. Ca2+/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. **Cell Calcium**, London, v. 13, p. 427-34, 1992.

SCHOENWALD, R. D. Ocular pharmacokinetics. In: ZIMMERMAN, T. J. (Ed.). **Textbook of ocular pharmacology**. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1997. p. 119-138.

SENNLAUB, F.; COURTOIS, Y.; GOUREAU, O. Nitric Oxide Synthase–II Is Expressed in Severe Corneal Alkali Burns and Inhibits Neovascularization. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v. 40, n. 12, p. 2773-2779, 1999.

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**, Philadelphia, v. 27, n. 10, p. 1148-1150, 2008.

SHOWELL, H. J.; PETTIPHER, E. R.; CHENG, J. B.; et al. The in vitro and in vivo pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B4 receptor antagonist CP-105696. **Journa of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 273, n. 1, p. 176-184, 1995.

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

SOSNE, G.; CHRISTOPHERSON, P. L.; BARRETT, R. P.; FRIDMAN, R. Thymosin-beta4 modulates corneal matrix metalloproteinase levels and polymorphonuclear cell infiltration after alkali injury. **Investigative Ophthalmolgy Visual Science**, Philadelphia, v. 46, n. 7, p. 2388-2395, 2005.

SPARROW, J. R.; NATHAN, C. F.; VODOVOTZ, Y. Cytokine regulation of nitric oxide synthase in mouse retinal pigment epithelial cells in culture. **Experimental Eye Research**, London, v. 59, p. 129-139, 1994.

STERN, N. E.; GAO, J.; BEUERMAN, R. W.; FARLEY, W.; ZHUO, L.; MCDONNELL, P. J.; PFLUGFELDER, S. C. Effects of fourth-generation fluorquinolones on the ocular surface, epithelium, and wound healing. **Cornea**, Philadelphia, v. 25, n. 9, p. S12-S24, 2006.

SUNDERKOTTER, C.; BEIL, W.; ROTH, J.; SORG, C. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. **American Journal of Pathology**, New York, v. 138, p. 931-939, 1991

SUN, R.; GIMBEL, H. V. Effects of topical ketorolac and diclofenac on normal corneal sensation. **Journal of Refractive Surgery**, Thorofare, v. 13, p. 158-161, 1997.

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

TAKAHASHI, N.; MIYAKOSHI, M.; TAKA, N, et al. [Cytotoxic effects of diclofenac sodium]. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 97, p. 145-149, 1993.

TALWAR, M.; MOYANA, T. N.; BHARADWAJ, B.; YAN, L. K. The effect of a synthetic analogue of prostaglandin E2 on wound healing in rats. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, Middlebury, v. 26, p. 451–457, 1996.

TRATTLER, W.; MCDONALD, M. Double-masked comparison of ketorolac tromethamine 0.4% versus nepafenac sodium 0.1% for postoperative healing rates

and pain control in eyes undergoing surface ablation. **Cornea**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 665-669, 2007.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 38, p. 97–120, 1998.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature - New Biology**, London, v. 231, p. 232–235, 1971.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**, Basel, v. 47, p. S78–S87, 1998.

VISSE, R.; NAGASI, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, p. 827-839, 2003.

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

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

WHITTLE, B. J. R.; HIGGS, G. A.; EAKINS, K. E.; MONCADA, S.; VANE, J. S. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. **Nature**, New York, v. 284, p. 271–273, 1980.

WIGGINS, R. E.; JAFRI, M. S.; PROIA, A. D. 12(S)-hydroxy 5,8,10,14-eicosatetraenoic acid is a more potent neutrophil chemoattractant than the 12(R) epimer in the rat cornea. **Prostaglandins**, Philadelphia, v.40, p. 131–141, 1990.

WILLIAMSON, J. S. P.; DIMARCO, S.; STREILEIN, J. W.; Immunobiology of Langerhans cells on the ocular surface. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 28, p. 1527–1532, 1987.

WOESSNER, J. F.; NAGASI, H. W. **Matrix metalloproteinases and TIMPs**. Oxford: Oxford University Press, 2002.

WOLF, G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 12, p. 251-61, 1997.

YE, H. Q.; AZAR, D. T. Expression of Gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during Corneal Wound Healing. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Rockville, v. 39, p. 913-921, 1998.

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**, New York, v. 20, n. 4, p. 465-482, 2000.

YOKOTA, H.; KUMATA, T.; TAKETABA, S.; KOBAYASHI, T.; MOUE, H.; TANIYAMA, H.; HIRAYAMA, K.; KAGAWA, Y.; ITOH, N.; FUJITA, O.; NAKADE, T.; YUASA, A. High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. **Biochimical et Biophysical Acta**, Ebetsu, v. 1568, n. 1, p. 7-12, 2001.

YOSHINOBU, O.; SABURO, S.; HARUTOSHI, F.; TAKEHIKO, Y. Nitric oxide via inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 73, p. 107-116, 1997.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MASINI, E., AMERINI, S.; GRANGER, H. J.; MAGGI, C. A.; GEPPETTI, P.; LEDDA, F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 94, p. 2036–2044, 1994.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L; CHOUDHURI, R.; ZHANG, H. T.; DONNINI, S.; GRANGER, H. J.; BICKNELL, R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 99, p. 2625–2634, 1997.