

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DA METALOPROTEASE-1, DA METALOPROTEASE-9  
E DO FATOR DE CRESCIMENTO OPIÓIDE, EM CÓRNEAS DE  
COELHOS TRATADAS COM NALBUFINA À 1%, APÓS  
CERATECTOMIA LAMELAR**

**Miguel Ladino Silva  
Médico Veterinário**

**2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DA METALOPROTEASE-1, DA METALOPROTEASE-9  
E DO FATOR DE CRESCIMENTO OPIÓIDE, EM CÓRNEAS DE  
COELHOS TRATADAS COM NALBUFINA À 1%, APÓS  
CERATECTOMIA LAMELAR**

**Miguel Ladino Silva**

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus**

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

**2012**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Miguel Ladino Silva nasceu na cidade de Bogotá, Colômbia, no dia 24 de Março de 1982. Estudo no colégio Colégio Santo Tomas de Aquino onde se formou no ano de 1998. Durante o ano de 1999, prestou serviço militar no batalhão de armas e serviços No. 15 na cidade de Bogotá. Depois ingressou na Universidade Nacional de Colombia no ano 2000, instituição que lhe outorgou o título de Medico Veterinário no ano de 2006. Depois de atuar como profissional autónomo, ingressou na Universidade Estadual Paulista na qual obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária (2009). Neste mesmo campus desenvolveu seus estudos de doutorado prestes a sua conclusão.

## DEDICATORIA

A meus pais, meu irmão e minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e meu irmão, minhas razões de viver, pelo apoio, pela força que sempre deram para nunca desistir, pelos conselhos, por me acalmar e pela paciência. Tudo o que eu sei e como eu sou são graças a vocês. Nunca serão suficientes as palavras para agradece-lhes e para falar quanto amo vocês.

Ao Professor Laus pela oportunidade que me dera, por abrir as portas do serviço, pelos conselhos e pelas broncas, que fizeram que eu amadurasse como profissional e como pessoa.

A Ge, pelo amor, pela paciência e por esse sorriso que me dá de presente todos os dias. Sem você não tivesse conseguido chegar até aqui.

A minha família, minhas tias Marlen, Stella, Martha, Zoila, Alicia, meus tios Germán, Guillermo, Edgar, Miguel, Hector. Meu primo, Juan Memo, um irmão que sempre este ai quando eu preciso e que sempre me apoia. Meu primos, Carlitos, Martica, Carlos Andres, Mauricio, Rodrigo, Ricardo, Marlen, Myriam, Sofita e o restante todo da família.

A senhora Maria Luiza, suas orações cuidaram de mim todos os dias.

Ao pessoal da Republica “Antro do HV” aqueles que abriram as portas da sua casa me ajudaram, me apoiaram e foi minha família no Brasil.

Ao pessoal de oftalmo, especialmente, ao Alexandre “Dedo”, um verdadeiro amigo, e ao Luciano, grande pessoa e grande profissional.

Dunia, Giovanny e Ricardo, amigos que fizeram que a Colômbia não ficasse tão longe e que sempre estiveram quando precise do apoio deles.

Pupi, Laika, Francisco, Carla, Menininha, Totto cachorrinhos que fazem que cada dia goste mais de meu trabalho e deles.

Aos proprietários e seus pequenos, todo eles faz que todos os dias eu sinta orgulho e felicidade de ser médico veterinário.

Aos pequenos coelhos que prestaram sua vida para o desenvolvimento desta pesquisa, sua vida vale mais que a vida de qualquer um de nós, obrigado.

A todas as pessoas que fizeram do Brasil minha casa e meus amigos na Colômbia que nunca me esqueceram, muito obrigado!!!!!!!!!!

A FAPESP pelo auxilio à pesquisa e a CAPES pela bolsa PEC-PG.

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| SUMÁRIO .....                                       | I             |
| LISTA DE TABELAS.....                               | II            |
| LISTA DE FIGURAS.....                               | III           |
| RESUMO.....   | VI            |
| ABSTRACT.....                                       | VIII          |
| 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....          | 1             |
| 2. JUSTIFICATIVA.....                               | 5             |
| 3. OBJETIVOS.....                                   | 6             |
| 3.1 Objetivos Gerais.....                           | 6             |
| 3.2 Objetivos Específicos.....                      | 6             |
| 4. MATERIAL E MÉTODO.....                           | 7             |
| 4.1 Considerações quanto à ética.....               | 7             |
| 4.2 Pacientes.....                                  | 7             |
| 4.3 Grupos Experimentais.....                       | 7             |
| 4.4 Solução de Nalbufina.....                       | 8             |
| 4.5 Ceratécotomia Lamelar.....                      | 8             |
| 4.6 Tempo de Reepitelização e Estesiômetria .....   | 9             |
| 4.8 Histologia e Morfometria .....                  | 10            |
| 4.9 Imunoistoquímica.....                           | 10            |
| 4.10 Análise à estatística.....                     | 11            |
| 5. RESULTADOS.....                                  | 13            |
| 5.1 Tempo de reepitelização.....                    | 13            |
| 5.2 Estesiometria.....                              | 14            |
| 5.3 Histologia, Morfometria e Imunoistoquímica..... | 16            |
| 6. DISCUSSÃO.....                                   | 27            |
| 7. CONCLUSÃO.....                                   | 35            |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                  | 36            |

## LISTA DE TABELAS

Página

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Classificação da imunomarcção por índice semi-quantitativo de córneas de coelho macho adulto da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2012 ..... | 11 |
|---|----|

## LISTA DE FIGURAS

### Página

- Figura 1.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), dos valores relativos ao tempo de reepitelização da área ulcerada em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2012 ..... 13
- Figura 2.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto aos valores, em percentual, da área ulcerada circundada, imediatamente à ceratectomia lamelar e diariamente até a sua reepitelização, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2012..... 14
- Figura 3.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto aos valores basais, do limiar de sensibilidade ao toque córneoal (cumprimento do estesiômetro expressado em milímetros) em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2012..... 15
- Figura 4.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto aos valores do limiar de sensibilidade ao toque córneoal (mm), em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco decorridas 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228 e 240 horas da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2011..... 16
- Figura 5.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A, C e E) e nalbufina (GN) (B, D e F), decorridos 1 (A e B), 5 (C e D) e 9 (E e F) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e B, a ausência de epitélio e exposição das fibras de colágeno e edema estromal na região trepanada (setas). Em C e D, monocamada de células epiteliais (setas). Em E e F, reepitelização corneal evidenciando epitélio estratificado



|  |    |
|--|----|
| pavimentoso (setas). Hematoxilina & Eosina. Magnificação 100X. Jaboticabal, 2012 .....   | 17 |
| <b>Figura 6.</b> Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e B células inflamatórias polimorfonucleares permeando o estroma na área trepanada (setas). Em C, observa-se epitélio corneal e célula mononuclear (seta), edema e separação das fibras de colágeno. Em D epitélio corneal sem infiltração inflamatória Hematoxilina & Eosina. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2012..... | 18 |
| <b>Figura 7.</b> Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao percentil de células polimorfonucleares, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2012.....  | 19 |
| <b>Figura 8.</b> Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao percentil de células mononucleares, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2012.....   | 19 |
| <b>Figura 9.</b> Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e C, imunomarcção da MMP-1 nas células basais (setas) e no estroma corneal. Em B e D, observar diminuição na imunomarcção da MMP-1 nas células basais. Polímero ligado a peroxidase. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2012 .....  | 21 |
| <b>Figura 10.</b> Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao escore de marcação da MMP-1 em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2012.....   | 22 |

- Figura 11.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e C imunomarcção da MMP-9 em células basais (setas) e no estroma corneal. Em B e D, diminuição na imunomarcção de MMP-9 nas células basais. Polímero ligado a peroxidase. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2012..... 23
- Figura 12.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao escore de marcação da MMP-9 em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2012..... 24
- Figura 13.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e C imunomarcção do OGF nas células basais e intracitoplasmática (setas). Ausência do OGF no estroma.. Em B e D, marcação de OGF em concentrações similares entre os grupos. Polímero ligado a peroxidase. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2012..... 25
- Figura 14.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao escore de marcação da OGF em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2012..... 26

## **EXPRESSÃO DA METALOPROTEASE-1, DA METALOPROTEASE-9 E DO FATOR DE CRESCIMENTO OPIÓIDE, EM CÓRNEAS DE COELHOS TRATADAS COM NALBUFINA À 1%, APÓS CERATECTOMIA LAMELAR**

### **RESUMO**

Estudaram-se os efeitos da nalbufina à 1% sobre a reparação e o limiar de sensibilidade ao toque córneoal (LSC), em coelhos submetidos à ceratectomia lamelar. Compuseram-se dois grupos (n=6). O grupo nalbufina (GN) recebeu 30µL de nalbufina à 1%, a cada 4 horas, totalizando 4 aplicações diárias, às (7, 11, 15 e 19 horas), o controle (GC) recebeu solução fisiológica nas mesmas condições adotadas para o GN. Decorridas as ceratectomias, procedeu-se a avaliação clínica das córneas com lâmpada em fenda e estesiômetro durante 9 dias. As córneas foram colhidas para estudo histológico, imunoistoquímico (metaloprotease-1, metaloprotease-9 e Fator de Crescimento Opióide). O tempo médio de reepitelização das córneas foi de  $7 \pm 1,79$  dias no GN e, no GC de  $8,83 \pm 1,17$  dias, sem diferença estatística entre os grupos ( $p=0,12$ ). O diâmetro da área ulcerada não diferiu entre os grupos em nenhum dos períodos ( $p>0,05$ ). 24 horas previas a realização da ceratectomia (valores basais) e, após a realização desta até a completa reparação corneal, o LSC não diferiu entre GC e GN ( $p>0,05$ ). À histologia, não foram observadas alterações quanto a reparação tecidual. Ao décimo dia, todas as córneas mostraram estratificação do epitélio corneal e edema corneal em ambos os grupos. À imunoistoquímica, as MMP-1 e MMP-9 apresentaram um aumento quanto sua expressão nos 5 primeiros dias após a realização da ceratectomia em ambos os grupos sem diferenças significativas ( $p>0,05$ ). Os dias 7 e 9, elas sofrem uma diminuição significativa comparativamente com os dias mas continua sem apresentar

diferença entre os grupos. O fator de crescimento opióide (OGF) apresentou imunomarcção constantes em todos os períodos e sempre restrito as células epiteliais mas não foram encontradas diferenças entre os grupos nem entre os períodos. Conclui-se que a o uso local de nalbufina à 1% não promoveu analgesia corneal nem alterações quanto a reparação corneal, expressão das MMP-1, MMP-9 e do Fator de Crescimento Opióide em coelhos submetidos à ceratectomia lamelar.

**Palavras chave:** córnea, analgesia, reepitelização, dor, inflamação.

## **EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-1, -9 AND OPIOID GROWTH FACTOR IN KERATECTOMIZED RABBIT CORNEAS TREATED WITH 1% NALBUPHINE .**

### **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the effects of 1% nalbuphine on corneal analgesia in rabbits submitted to lamellar keratectomy until completion of the corneal wound healing and to assess the expression of matrix metalloproteinases (MMPs)-1,-9, and opioid growth factor (OGF) during the treatment. Two groups were formed (n=6). The nalbuphine-treated group (NG) received 30 µl of topical 1% nalbuphine every 4 hours while the other group received 0.9% NaCl instead (CG). After keratectomies, corneal healing were evaluated with slit lamp and the corneal touch threshold (CTT) with esthesiometer during 9 days. Corneal samples were processed for histology and immunohistochemistry (MMP-1, -9 and OGF). Mean corneal reepithelization rate was of  $7 \pm 1.79$  days in NG and of  $8.83 \pm 1.17$  days in the CG ( $P=0.12$ ). The ulcerated area did not differed between groups at any time point ( $P>0.05$ ). CTT did change from baseline, until complete healing of the corneas in both groups ( $P>0.05$ ). At histology, corneal healing was uneventful. At day 10, all corneas showed corneal edema and stratification of the corneal epithelium in both groups. In both groups, MMP-1 and -9 expression increased during the first 5 days following keratectomy ( $P>0.05$ ). At day 7 and 9 expression of both enzymes decreased significantly in comparison to previous time points, without changing significantly between groups ( $P>0.05$ ). OGF positive labeling was observed in all time points and was restricted to the corneal epithelium of both groups ( $P>0.05$ ). It was concluded that topical 1%

nalbuphine did not change corneal healing rate, MMP-1, -9, and OGF expression after lamellar keratectomy in rabbits.

**Key words:** cornea, analgesia, wound healing, pain, inflammation

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A córnea íntegra constitui o tecido mais innervado do organismo, cuja densidade de fibras nervosas é de 300 a 600 vezes maior que a da pele (BENÍTEZ-DEL-CASTILLO et al., 2007). Destacam-se os axônios nociceptivos aferentes derivados dos nervos ciliares longos, uma divisão do nervo trigêmeo, os quais perdem o seu envoltório de mielina. Há inervação simpática, derivada do gânglio cervical superior (GELATT, 2007; MARFURT et al., 2001; BENTLEY & MURPHY, 2004).

Das fibras nervosas corneais, 20% são sensíveis a estímulos mecânicos (mecano-nociceptores), 70% a altas temperaturas, a estímulos químicos externos e a mediadores inflamatórios endógenos (receptores polimodais), e 10% sensíveis a baixas temperaturas (BELMONTE et al., 2004).

Dois tipos de estesiômetros para avaliação da sensibilidade corneal são encontrados. O estesiômetro de contato (COCHET & BONNET, 1960) e os estesiômetros de não contato (MURPHY et al., 1996; BELMONTE et al., 1999; STAPLETON et al., 2004).

Alterações na sensibilidade corneal podem decorrer de neuropatias, como a paralisia do nervo trigêmeo e as disautonomias (NIESSEN et al., 2007; TERZIS et al., 2010); de cirurgias refrativas (BENÍTEZ-DEL-CASTILLO et al., 2001; STACHS et al., 2010); de processos inflamatórios virais crônicos (herpes-vírus) (GALLAR et al., 2010) e doenças sistêmicas como Diabete Mellito e a Síndrome de Sjögren (BOURCIER et al., 2005; BENÍTEZ-DEL-CASTILLO et al., 2007; COUSEN et al., 2007).

Os seres humanos e os animais frequentemente desenvolvem ceratites ulcerativas de origem traumática (van der WOERDT, 2004; WILLIAMS & KIM, 2009), infecciosa (YANG et al., 2006; GALLAR et al., 2010; GOULD, 2011), auto-imune (ANDREW, 2008; JONSSON et al., 2011), por ação direta de agentes químicos (GICQUEL, 2011), neurogênica (TERZIS et al., 2010; IOANNIDIS et al., 2011;) e espontânea (MURPHY et al., 2001; LEDBETTER et al., 2006).

As ceratites ulcerativas ensejam desconforto e dor, pela ativação de nociceptores localizados predominantemente na camada superficial da córnea. A dor

a elas atribuída é de difícil controle (STILES et al., 2003). São reconhecidos dois tipos de conduta (direta e indireta), visando ao seu manejo. Na indireta, busca-se acelerar a reepitelização, evitando-se a exposição, por longo tempo, dos nociceptores (STILES et al., 2003). Na direta, procura-se o controle da dor pela utilização de fármacos antiinflamatórios ou de opióides (STILES et al., 2003; BELMONTE et al., 2004)

Defeitos córneo-epiteliais espontâneos crônicos são afecções corneais comuns, que obrigam a manobras de desbridamento e a ceratotomias (WHITLEY & GILGER, 1999; MURPHY et al., 2001; LEDBETTER et al., 2006). Indivíduos acometidos habitualmente manifestam dor de duração variável (STILES et al. 2003; LEDBETTER et al., 2006).

Em córneas sadias e nas ulceradas, a ação local de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) pode produzir algum grau de analgesia (ARAGONA et al., 2000; SZUCS et al., 2000; ACOSTA et al., 2005; ACOSTA et al., 2007; DONNENFELD et al., 2007). Não obstante, sua administração local ou sistêmica pode retardar a reparação corneal, induzir “melting” e perfurações (LIN et al., 2000; FLACH, 2001; GUIDERA et al., 2001; BEKENDAM et al., 2007; FEIZ et al., 2009; MASUDA et al., 2010; KHALIFA & MIFFLIN, 2011). O uso tópico de anestésicos não é indicado, notadamente por suas propriedades epiteliotóxicas (ROSENWASSER et al, 1990; MOREIRA et al., 1999; PHARMAKAKIS et al, 2002). Ball et al. (2010), mostraram, todavia, que em lesões corneais agudas, uma única aplicação local de proparacaína à 0,05% pode diminuir a dor, sem induzir efeitos colaterais.

Há décadas, os opióides são utilizados parenteralmente como analgésicos. Eles se ligam a receptores endógenos, produzindo efeitos anti-nociceptivos no sistema nervoso central. Dados sugerem que a aplicação local de opióides pode produzir analgesia e efeitos antiinflamatórios, uma vez que há receptores opióides em tecidos periféricos (STEIN et al., 1988; STEIN et al., 1989; WENK & HONDA, 1999; STILES et al., 2003; WENK et al., 2003).

A nalbufina é um opióide agonista  $\kappa$ /antagonista  $\mu$ , que produz analgesia de moderada a severa. Seus efeitos assemelham-se aos dos opióides agonistas, porém não invocam alterações comportamentais (HOSKIN & HANKS, 1991).



Reporta-se sobre o uso da nalbufina na pré-medicação, no trans-operatório e no pós-operatório de práticas obstétricas, pediátricas e no controle da dor em queimaduras (GLANVILLE, 1990; CALENDÁ et al, 1999, van den BERG et al., 1999; MINAI & KHAN, 2003; CALENDÁ et al, 2004; VAVRINKOVÁ et al., 2005; MOYAO-GARCÍA et al., 2009; RENNER et al., 2010; TOURTIER et al., 2010; LIAO et al., 2011).

Estudos têm sido desenvolvidos para o melhor entendimento da ação anti-nociceptiva sistêmica e local da nalbufina. Resultados têm demonstrado que ela é dependente da dose utilizada, do sexo do paciente e do sítio de aplicação (GEAR et al, 1996; GEAR et al, 1999; SMITH & FRENCH, 2002; AQUINO et al. 2005; LOMAS et al, 2007; KSHIRSAGAR et al., 2008).

Mostrou-se que a instilação oftálmica de nalbufina aumenta o limiar de tolerância, quanto à sensibilidade corneal, em cães saudáveis (AQUINO et al. 2005). Não obstante, em um estudo realizado com cavalos demonstrou que a aplicação tópica de 0,2mL de nalbufina à 1% não alterou o limiar de sensibilidade ao toque em córneas saudáveis (WOTMAN & UTTER, 2010)

A reparação cicatricial da córnea decorre de eventos que envolvem a migração celular centrípeta, a diferenciação e a proliferação de células, bem como a sua adesão (ZAGON, et al, 1998; ZAGON et al, 2000). Tratam-se de condições moduladas por mediadores presentes na matriz extracelular do estroma, pela força mecânica exercida pelos movimentos palpebrais (BENTLEY & MURPHY, 2004), pela viabilidade da membrana basal do epitélio (MURPHY et al., 2001) e pelas condições do filme lacrimal pré-corneal (BROOKS & OLLIVER, 2004).

Por sua importância na manutenção e na recuperação do epitélio e do estroma corneais, as metaloproteases da matriz extracelular (MMPs) têm sido estudadas nos âmbitos da oftalmologia médica (SMITH et al., 2001; DANIELS et al., 2003; LEONARDI et al., 2003; REVIGLIO et al., 2003; SAKIMOTO et al., 2003; MULHOLLAND et al., 2005) e da veterinária (STRUBBE et al., 2000; OLLIVIER et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; COUTURE et al., 2006; BARROS et al., 2007).

As MMPs são proteases endógenas pertencentes a uma família de enzimas dependentes de zinco e de cálcio, necessárias em processos homeostáticos. Elas

estão envolvidas na remodelação tecidual e na sua reparação, bem como na destruição de tecidos (BROOKS & OLLIVER, 2004).

As metaloproteases são compostas por quatro classes de enzimas: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromalisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e as “*membrane type*” (MMP-14, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) (BROOKS & OLLIVER, 2004). No curso da reparação cicatricial da córnea, elas desempenham considerável atividade na lágrima (STRUBBE et al., 2000; SMITH et al., 2001; OLLIVIER et al., 2003; OLLIVIER et al., 2004; COUTURE et al., 2006; WANG et al., 2008) e no tecido corneal lesado (DANIELS et al., 2003; MULHOLLAND et al., 2005), induzindo a efeitos diversos, como sobre a vascularização (EBRAHEM et al., 2010) . Mostrou-se atividade da MMP-1 em células epiteliais e da MMP-9 na remodelação do estroma corneal, em coelhos que passaram por ceratectomia lamelar (MULHOLLAND et al., 2005).

Peptídeos opióides foram primeiramente reportados por Hughes em 1975 (ZAGON et al., 2002). O Fator de Crescimento Opióide (OGF) ou [Met5] Encefalina é um peptídeo natural endógeno encontrado em diferentes tecidos do corpo, que interage com o receptor zeta ou OGF<sub>r</sub> (ZAGON et al., 1995, ZAGON et al., 2003). Nas espécies domésticas, o OGF e o seu receptor foram identificados em cães, em gatos e em cavalos, em grande concentração no epitélio corneal (ROBERTSON & ANDREW, 2003). Relativamente às suas funções, reportam-se a inibição do crescimento de células normais e tumorais, a remodelação celular, a reparação de lesões e a angiogênese (ZAGON et al., 1998; BLEBEA et al., 2000; ZAGON & MCLAUGHLIN, 2005; ZAGON et al., 2005). Na córnea, células basais e parabasais do epitélio o possuem. O OGF se encontra no interior do citoplasma, junto à membrana nuclear e no interior do núcleo. O OGF<sub>r</sub>, por sua vez, é encontrado exclusivamente no citoplasma (ZAGON et al., 2003).

A instilação de naltrexona, um antagonista não específico de receptores opióides, acelerou a reepitelização corneal em coelhos (ZAGON et al., 1998), em seres humanos (ZAGON et al., 2000) e em ratos diabéticos, por inibição do Fator de Crescimento Opióide (ZAGON et al., 2002).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Um único trabalho, quanto ao uso tópico da nalbufina e à sua ação sobre a sensibilidade corneal, foi encontrado na literatura consultada (AQUINO et al, 2005).

Devido a isto, procura-se avaliar os efeitos da nalbufina sobre o limiar de sensibilidade ao toque corneal em coelhos submetidos a ceratectomia lamelar tratados com nalbufina à 1%.

Não existem trabalhos, na literatura consultado, que avaliam os efeitos da instilação oftálmica de nalbufina à 1% e seus efeitos sobre a reepitelização corneal.

Todavia, pretende-se avaliar os efeitos sobre a reepitelização corneal baseando-se nos possíveis efeitos antagonistas da nalbufina sobre a expressão do fator de crescimento opióide e das metaloproteases-1 e -9.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar a expressão de metaloproteases da matriz estromal (MMPs) e do Fator de Crescimento Opióide (OGF), após ceratectomias lamelares e tratamento local com nalbufina à 1%, em coelhos machos, adultos da raça Nova Zelândia Branco.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar se a nalbufina à 1% interfere com a reparação corneal, valendo-se, para a investigação, da biomicroscopia com lâmpada em fenda, do tingimento da córnea pela fluoresceína, da histopatologia e da imunohistoquímica. Adjunto, empregando-se marcadores específicos para MMP-1, MMP-9 e para o Fator de Crescimento Opióide, paralelamente à avaliação do limiar de sensibilidade ao toque corneal à estesiometria.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES QUANTO À ÉTICA

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)*, de consoante com o código de NÜREMBERG (GOLDIM, 1995). Outrossim, sob expressa autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 028793-08).

### 4.2 PACIENTE

Setenta e dois coelhos (*Oryctolagus cuniculus*; Linnaeus 1758), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos, com peso médio de 3 kg foram utilizados na consecução da pesquisa. Os animais foram submetidos a avaliação clínica e oftalmológica, realizando-se o teste da lágrima de Shirmer<sup>1</sup>, a biomicroscopia com lâmpada em fenda<sup>2</sup>, a tonometria de aplanção<sup>3</sup>, a oftalmoscopia binocular indireta<sup>4</sup> e a prova da fluoresceína<sup>5</sup>. Selecionados os hígidos, eles foram mantidos em ambiente ventilado, individualmente, em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, com dieta à base de ração comercial e de água potável “*ad libitum*”.

### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Constituíram-se dois grupos, compostos por 36 animais. No grupo nalbufina (GN), instilou-se, posteriormente à ceratectomia lamelar, 30µL da solução de nalbufina à 1%, 4 vezes ao dia a intervalos regulares. O grupo controle (GC) recebeu

---

<sup>1</sup> Teste da Lágrima de Schirmer – Ophthalmos Ltda.

<sup>2</sup> Slit Lamp SL-14 – Kowa Company Ltda.

<sup>3</sup> TonoPen XL, Medtronic

<sup>4</sup> Oftalmoscópio binocular indireto FOH-5 – Eyetec S.A.

<sup>5</sup> Fluoresceína strips – Ophthalmos Ltda.

30µL de solução fisiológica à 0,9%, nos mesmos horários e sob os mesmos critérios. Em ambos, os tratamentos tiveram início um dia antes da cirurgia (valores basais), e seis horas após a ceratectomia lamelar (M0).

Para profilaxia da infecção, todos os olhos foram tratados com colírio de tobramicina à 0,3%<sup>6</sup>. (HENDRIX et al. 2002). Instilaram-se 30µL da preparação, imediatamente ao final do procedimento cirúrgico e a intervalos regulares de 4 horas, totalizando quatro aplicações diárias, 20 minutos após a instilação da nalbufina no GN e da solução fisiológica no GC, até a reparação corneal.

#### **4.4 SOLUÇÃO DE NALBUFINA**

Soluções oftálmicas de nalbufina à 1%, sem conservante, foram manipuladas por fabricante credenciado<sup>7</sup>. O pH foi ajustado em 6,95, pela adição de solução tampão fosfato. As soluções foram mantidas à temperatura de 4°C e protegidas da luz.

#### **4.5 CERATECTOMIA LAMELAR**

Após a indução da anestesia, por injeção intramuscular de 15mg/kg de cetamina<sup>8</sup> associada a 0.5 mg/kg de midazolam<sup>9</sup> (BORKOWSKI & KARAS, 1999), realizou-se tricotomia periocular e instilação de uma gota de colírio de proximetacaína<sup>10</sup>. Procedeu-se à antissepsia da córnea, do saco conjuntival e da conjuntiva com solução de polivinil-pirrolidona, na diluição 1:50. A anestesia foi mantida empregando-se máscara com isoflurano<sup>11</sup>, diluído em oxigênio 100%, em circuito aberto.

Após preparo rotineiro do campo operatório, realizou-se a ceratectomia axial lamelar, em um dos olhos, empregando-se trépano de 200 µm de profundidade e 6 mm de diâmetro<sup>12</sup> e bisturi crescente angulado em 60 graus<sup>13</sup>. Todas as

---

<sup>6</sup>Tobrex, Alcon®, São Paulo, SP.

<sup>7</sup> Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos®, Campinas, SP.

<sup>8</sup> Cetamina – S(+), Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos®, Campinas, SP

<sup>9</sup> Dormire®, Cristália, São Carlos, SP

<sup>10</sup> Proximetacaína – Anestalcon, Alcon, São Paulo, Brasil.

<sup>11</sup> Isoflurano Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos®, Campinas, SP.

<sup>12</sup> Trépano para cornea 6mm, Steel Inox, São Paulo, SP .

intervenções foram realizadas pelo mesmo cirurgião, sob magnificação de 20X, em microscópio cirúrgico<sup>14</sup>.

#### 4.6 TEMPO DE REEPITELIZAÇÃO E ESTESIÔMETRIA

Doze animais, 6 de cada grupo, foram avaliados diariamente à biomicroscopia com luz em fenda e em filtro azul cobalto, após instilação de fluoresceína, sempre às 20h e pelo mesmo observador, que desconhecia qual o tratamento que fora aplicado, desde a consecução das úlceras à sua reepitelização corneal (teste de fluoresceína negativa). Para o monitoramento da evolução, quanto à reepitelização, os olhos foram fotografados, em iluminação com filtro azul cobalto, sem “flash”, a uma distância fixa de 10 cm. As imagens foram avaliadas em *software*<sup>15</sup>, para a quantificação da área ulcerada (STERN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2007, 2008; KIM et al., 2009).

Após a seleção das imagens (ferramenta *file/open*), a área ulcerada foi circundada com ferramenta *free hand selections*, e o valor transformado em percentagem de área ulcerada.

O limiar de sensibilidade ao toque córneoal (LSC) foi avaliado à estesiômetria<sup>16</sup> por um mesmo observador que igualmente desconhecia qual o tratamento que fora aplicado em 6 animais de cada grupo (STILES et al., 2003). Considerou-se a região axial, por seu maior quantitativo de terminações axonais. (KAPS et al., 2003; GOOD et al., 2003). Valores basais foram colhidos um dia antes da realização das manobras cirúrgicas. Dez minutos após cada tratamento com nalbufina à 1%, (GN) ou com solução salina à 0,9% (GC) avaliações foram feitas em quatro momentos e a intervalos regulares. Decorridas 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228 e 240 horas das ceratectomias, o limiar de sensibilidade ao toque córneoal foi avaliado decorridos 10 minutos de cada tratamento (RIBEIRO et al., 2012).

---

<sup>13</sup>Bisturi Crescente Angulado Ziemer Ophthalmic Systems AG - SWISS.

<sup>14</sup>MC-M902®, DF Vasconcelos, São Paulo, SP.

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

<sup>16</sup>Cochet-Bonett® - Lunaau, França.

#### 4.7 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA

Decorridos 1, 3, 5, 7, e 9 dias das ceratectomias lamelares, seis animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia ativa, por injeção intramuscular de 20mg/kg de cetamina<sup>17</sup> associada a 0,75 mg/kg de midazolam<sup>18</sup>, e posterior injeção intra-tecal de cloridrato de lidocaína à 2%<sup>19</sup>, sem vasoconstritor (RIBERIO et al., 2011). As córneas foram colhidas e fixadas em formaldeído tamponado à 10%. Decorridas 24 horas, elas foram lavadas em água corrente e mantidas em álcool à 70%. Posteriormente, foram submetidas a desidratação, a diafanização e a inclusão em blocos de parafina.

Para a histologia, as lâminas foram coradas pela hematoxilina e eosina e avaliadas sob magnificação de 400X em microscópio de luz. Foram escolhidos dez campos para realização de perfil celular.

#### 4.8 IMUNOISTOQUIMICA

Visando à avaliação da distribuição tecidual da metaloprotease-1 (MMP-1)<sup>20</sup>, da metaloprotease-9 (MMP-9)<sup>21</sup> e do Fator de Crescimento Opióide (OGF)<sup>22</sup>, empregou-se a técnica de polímero ligado a peroxidase. Lâminas previamente preparadas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se uma solução de álcool metílico<sup>23</sup> e peróxido de hidrogênio<sup>24</sup>, à concentração final de 8% (92mL metanol – 8mL peróxido de hidrogênio), por 20 minutos. Adicionou-se bloqueador de proteína<sup>25</sup> por mais 20 minutos. A incubação do anticorpo primário MMP 1 (1:200), MMP 9 (1:100) e fator de crescimento opioide (1:100) se fez em câmara úmida por 18 horas, a temperatura de 4°C. Ato contínuo, adicionou-se anticorpo secundário<sup>26</sup> e, para a revelação empregou-se tetra-hidrocloreto de

---

<sup>17</sup> Cetamina – S(+), Cristalia Produtos Químicos e Farmacêuticos®, Campinas, SP

<sup>18</sup> Dormire®, Cristalia, São Carlos, SP

<sup>19</sup> Xylestesin®, Cristalia, São Carlos, SP

<sup>20</sup> Anti-MMP 1 Rabbit pAb® – Cabiochem, Darmstad, Alemanha

<sup>21</sup> Anti-MMP 9(Ab-3) Mouse mAb (56-2A4)® – Cabiochem, Darmstad, Alemanha

<sup>22</sup> Anti-Enkephalin, Clone NOC1® – Cabiochem, Darmstad, Alemanha

<sup>23</sup> Alcool Metílico Comercial 100%®, Synth, Diadema, SP

<sup>24</sup> Peroxido de Hidrogenio 50%®, Synth, Diadema, SP

<sup>25</sup> Protein Block, sérum free 110mL®, DAKO, Carpinteria, EUA

<sup>26</sup> ADVANCE™ / HRP, Rabbit/Mouse, DAKO, Carpinteria, EUA



diaminobenzidina (DAB)<sup>27</sup> por três minutos, em cada lâmina. Empregou-se Hematoxilina de Harris<sup>28</sup> como contra-coloração e, posteriormente, as lâminas foram desidratadas e montadas em meio de montagem líquido<sup>29</sup>. Todos os passos foram precedidos por lavagens com solução tampão tris-HCL pH 7,4<sup>30</sup>.

As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz<sup>31</sup> (400X) e as imagens processadas em *software*<sup>32</sup>. Para a contabilização da intensidade e do percentil de células marcadas, empregou-se índice semi-quantitativo (STERN et al., 2006) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação da imunomarcação por índice semi-quantitativo de córneas de coelho macho adulto da raça Nova Zelândia Branco

| <b>Índice</b> | <b>Marcação</b>              |
|---------------|------------------------------|
| 0             | Ausência de marcação         |
| 1             | Marcação focal               |
| 2             | até 25% do campo marcado     |
| 3             | de 25-50% do campo marcado   |
| 4             | mais de 50% do campo marcado |
| 5             | mais de 75% do campo marcado |
| 6             | mais de 95% do campo marcado |

Fonte: Stern et al. (2006)

#### 4.10 ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados quanto à sua normalidade, aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Aplicou-se o teste *t*-Student para avaliação da média de dois grupos, quanto ao tempo de reparação corneal. Empregou-se, ainda, Análise de Variância para Medidas Repetidas e, posteriormente, o de Teste de Bonferroni nas avaliações relativas a estesiometria. Quanto aos parâmetros avaliados à histologia e à imunoistoquímica, foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, com

<sup>27</sup> DAB Chromogen® Rabbit/Mouse, DAKO, Carpinteria, EUA

<sup>28</sup> Solução de Hematoxilina de Harris®, Sigma Aldrich do Brasil, São Paulo, Brasil

<sup>29</sup> Meio de Montagem Aquoso, Fluoromount® – Sigma Aldrich do Brasil, São Paulo, Brasil

<sup>30</sup> Solução tampão pH 7,0 Synth, Diadema, SP

<sup>31</sup> Nikon Eclipse E200®, Nikon, Melville, NY, EUA

<sup>32</sup> Motic Image Plus 2.0, Hong-Kong, China

posterior avaliação pelo teste de Dunn, considerando-se o nível mínimo de significância  $p \leq 0,05$ <sup>33</sup>.

---

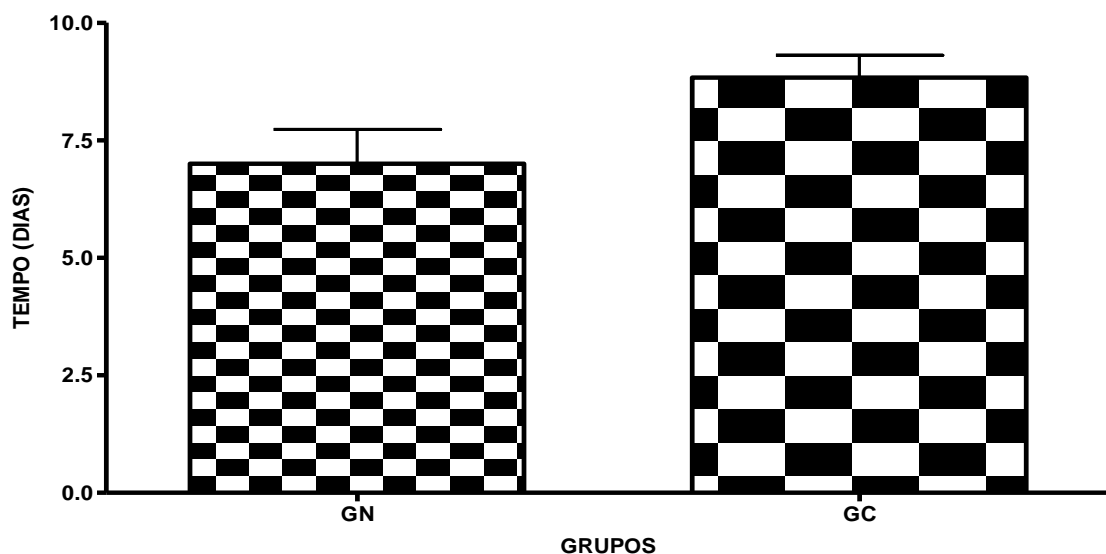
<sup>33</sup>GraphPad Prism 4.0®, GraphPad Software, Inc, La jolla, CA, USA

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TEMPO DE REEPITELIZAÇÃO

Imediatamente à consecução da ceratectomia lamelar, todos os indivíduos foram positivos à fluoresceína. Relativamente ao tempo de reepitelização, aos 8 dias após a ceratectomia, 83,33% (5/6) dos animais do GN apresentavam suas córneas reepitelizadas. Com relação aqueles do GC, 33,33% (2/6) apresentaram-se com a reepitelização completada. Aos 9 dias, 100% dos animais do GN foram negativos à fluoresceína. Os do grupo controle mostraram negatividade ao teste da fluoresceína decorridos 10 dias do procedimento cirúrgico.

O tempo médio de reepitelização das córneas no GN foi de  $7 \pm 1,79$  dias e, no GC de  $8,83 \pm 1,17$  dias. Não se encontrou diferença significativa entre ambos ( $p=0,12$ ) (Figura 1).

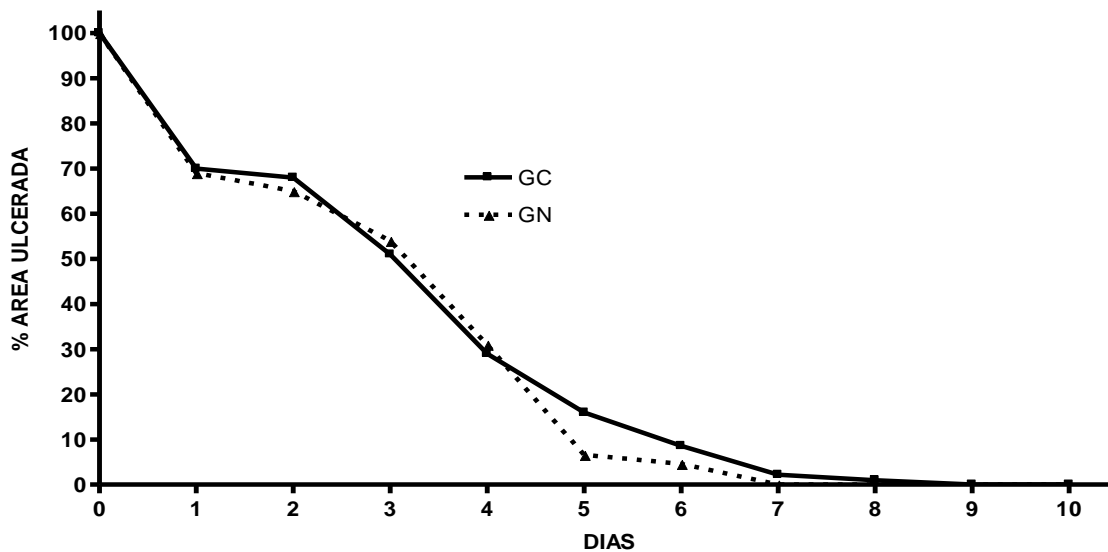


**Figura 1.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), dos valores relativos ao tempo de reepitelização da área ulcerada em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2011

\* Teste *t*-Student ( $p < 0.05$ )

Relativamente ao diâmetro da área submetida à trepanação (6 mm), aos 8 dias após a ceratectomia lamelar um único indivíduo do grupo nalbufina (olho

esquerdo) ainda apresentava 0,4% da área positiva à fluoresceína. Nos pacientes do grupo controle (olho direito), quatro ainda apresentavam positividade aos seis dias do pós-operatório (3,1%, 1%, 0,5% e 3,6%, respectivamente). Não foram encontradas diferenças significativas entre os percentuais das áreas ulceradas entre os dois grupos (Figura 2).

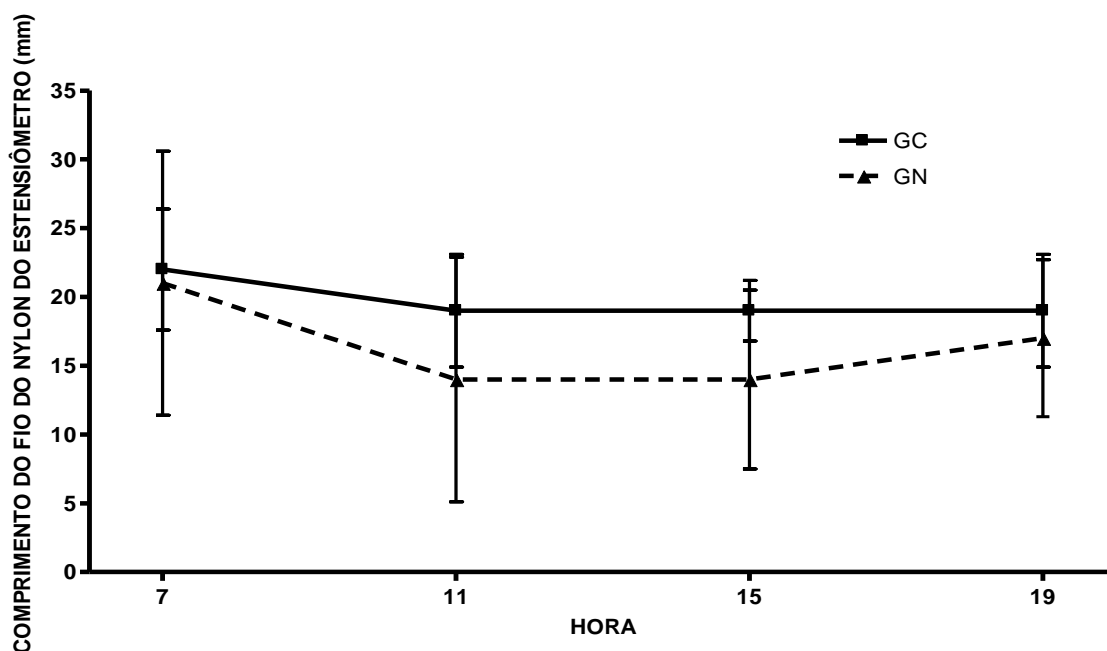


**Figura 2.** Mediana nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto aos valores, em percentual, da área ulcerada circundada, imediatamente à ceratectomia lamelar e diariamente até a sua reepitelização, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2011

\* Teste Dunn ( $p < 0.05$ )

## 5.2 ESTESIÔMETRIA

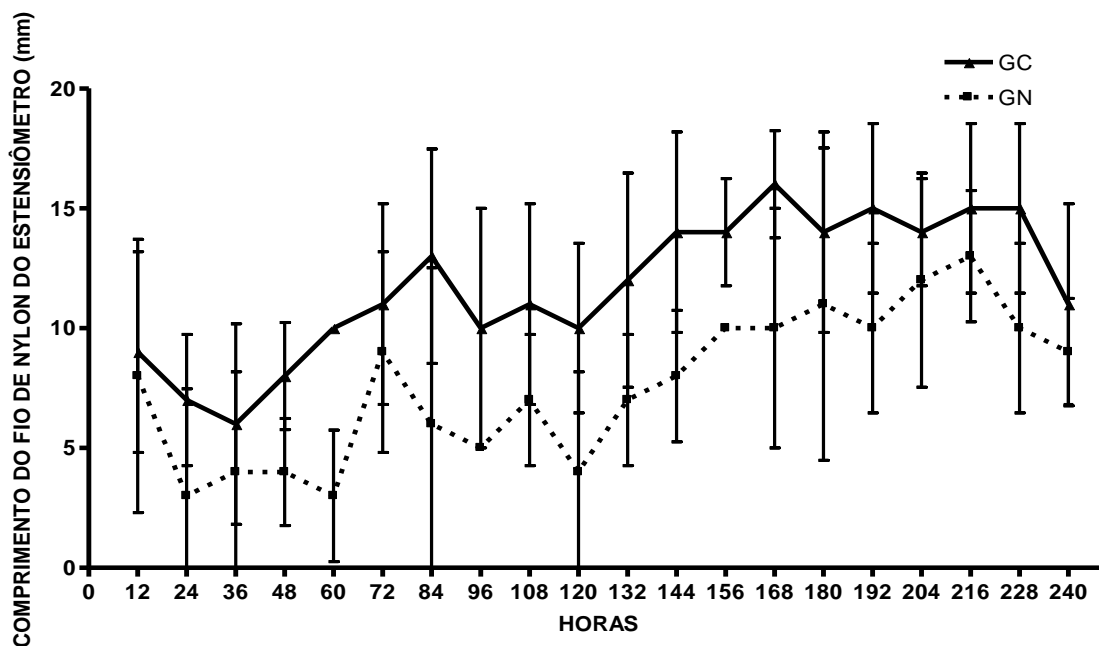
Relativamente aos valores basais 24 horas prévias à realização da ceratectomia lamelar, e aos 10 minutos após tratamento com nalbufina à 1% (GN) ou com solução salina à 0,9% (7h, 11h, 15h e 19h), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 3).



**Figura 3.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto aos valores basais, do limiar de sensibilidade ao toque córneoal basal (comprimento do estesiômetro expressado em milímetros) em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Jaboticabal, 2011

\* Teste Bonferroni ( $p < 0.05$ )

Em todos os momentos, após as ceratectomias, não foram encontradas diferenças significativas, quanto à sensibilidade corneal (mm), entre os grupos controle (GC) e nalbufina (GN) (Figura 4).

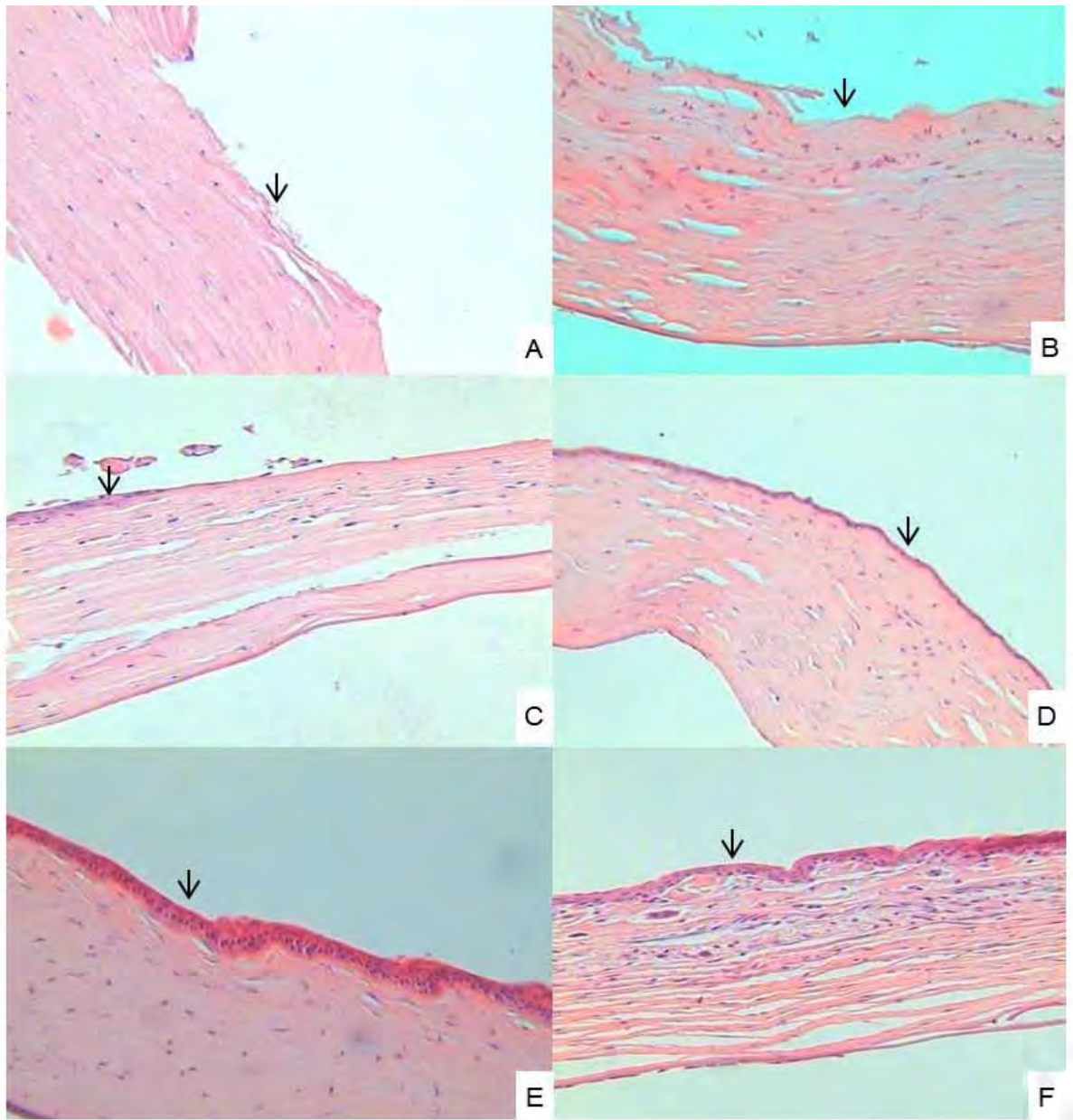


**Figura 4.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto aos valores do limiar de sensibilidade ao toque córnea (mm), em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, decorridas 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228 e 240 horas da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2011

\* Teste Bonferroni ( $p < 0.05$ )

### 5.3 HISTOLOGIA, MORFOMETRIA E IMUNOISTOQUÍMICA

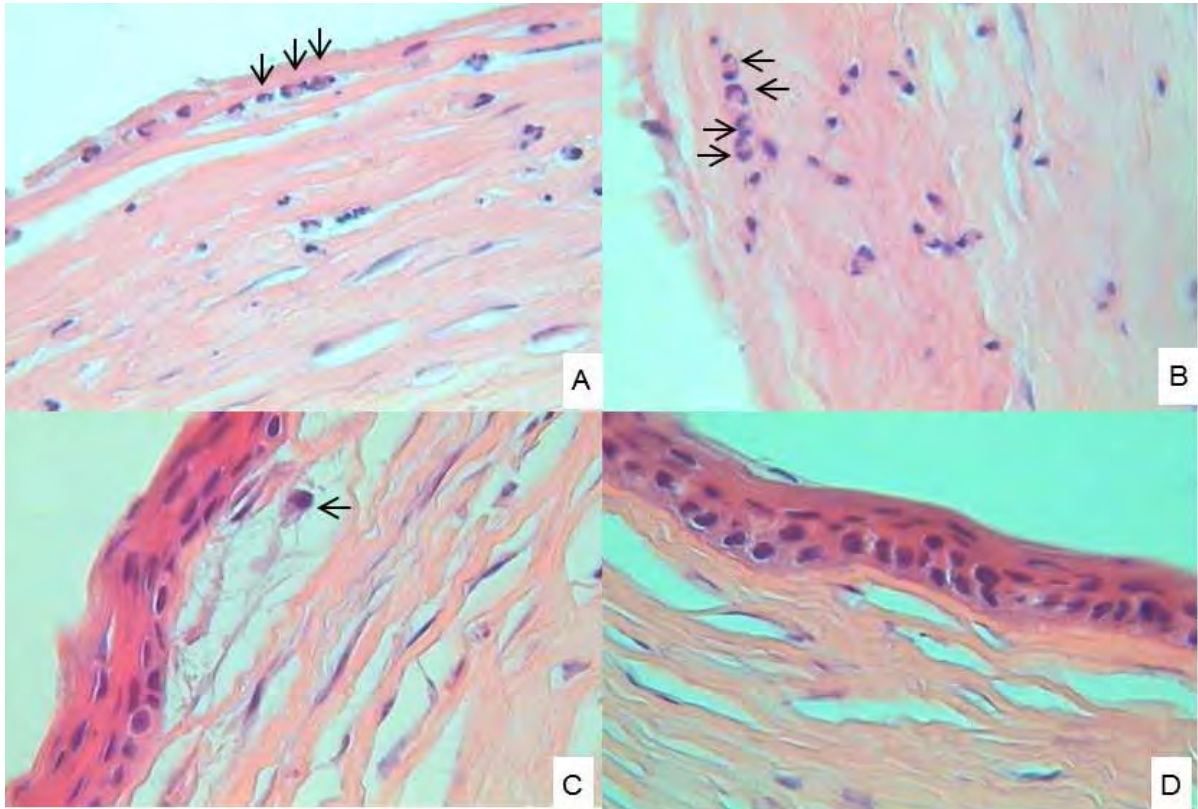
Evidenciaram-se ausência do epitélio, exposição e separação das fibras colágenas que compõem o estroma corneal, edema estromal e células inflamatórias na região trepanada, em 100% das córneas no primeiro dia da ceratectomia lamelar. Três dias após o procedimento, todos os indivíduos de ambos os grupos mostraram reparação tecidual em fase inicial, evidenciada pela presença de uma monocamada de células epiteliais migrando da borda da ferida cirúrgica para o centro da lesão. O estroma corneal manteve-se edematoso, com separação das fibras colágenas. Verificou-se, ao nono dia e em todos os indivíduos, proliferação de células epiteliais formando camadas, a não exposição das fibras de colágeno, mas edema e separação de algumas das fibras (Figura 5).



**Figura 5.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A, C e E) e nalbufina (GN) (B, D e F), decorridos 1 (A e B), 5 (C e D) e 9 (E e F) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e B, a ausência de epitélio e exposição das fibras de colágeno e edema estromal na região trepanada (setas). Em C e D, monocamada de células epiteliais (setas). Em E e F, reepitelização corneal evidenciando epitélio estratificado pavimentoso (setas). Hematoxilina & Eosina. Magnificação 100X. Jaboticabal, 2011

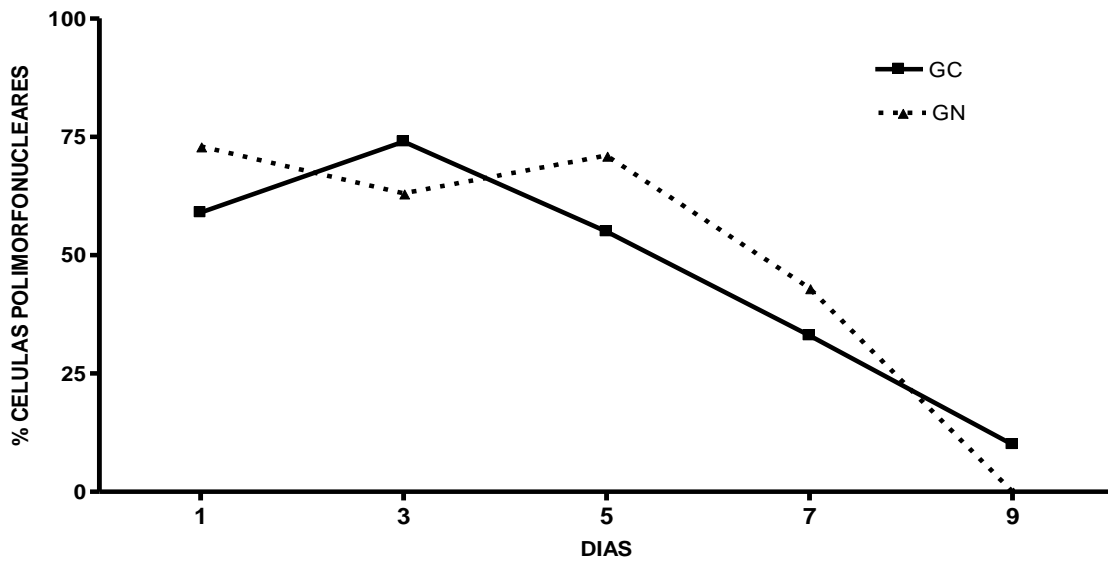
Não houve diferença significativa relativamente ao total das células inflamatórias ( $p=0,11$ ). Ao primeiro dia, observaram-se células polimorfonucleares,

com predominância de neutrófilos, infiltrando o estroma na região lesionada. Aos 7 e aos 9 dias, comparativamente aos 1, 3 e 5 dias, não houve diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 6 e 7). Ao nono dia, todas as córneas mostraram epitélio refeito e edema estromal (Figura 8). Observou-se menor porcentagem de células mononucleares no grupo nalbufina ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).



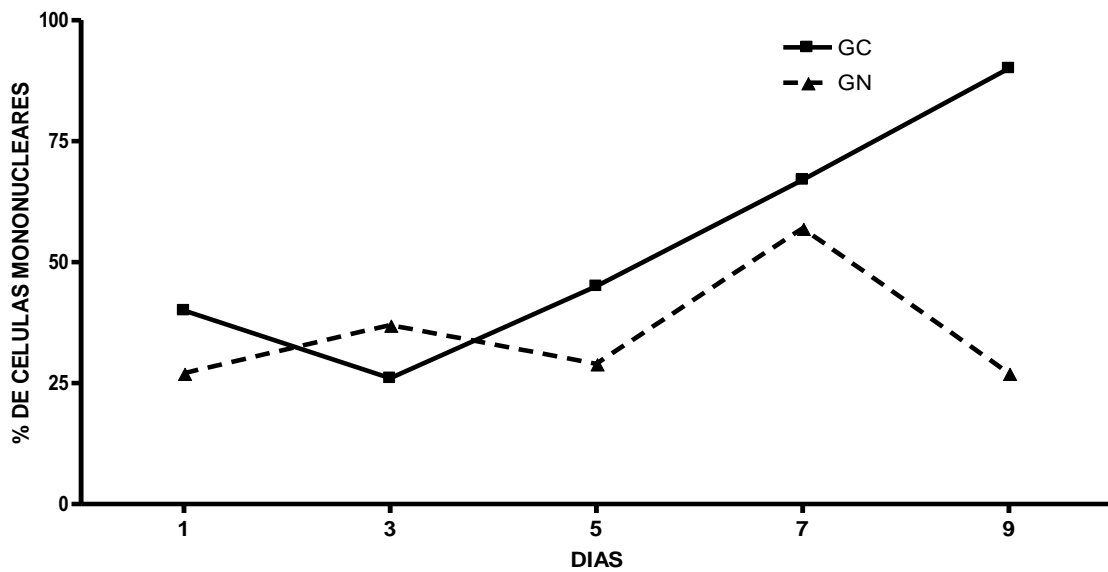
**Figura 6.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e B células inflamatórias polimorfonucleares permeando o estroma na área trepanada (setas). Em C, observa-se epitélio corneal e célula mononuclear (seta), edema e separação das fibras de colágeno. Em D epitélio corneal sem infiltração inflamatória Hematoxilina & Eosina. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2011





**Figura 7.** Mediana nos grupos controle (GC) e nalbupina (GN), quanto ao percentil de células polimorfonucleares, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2011

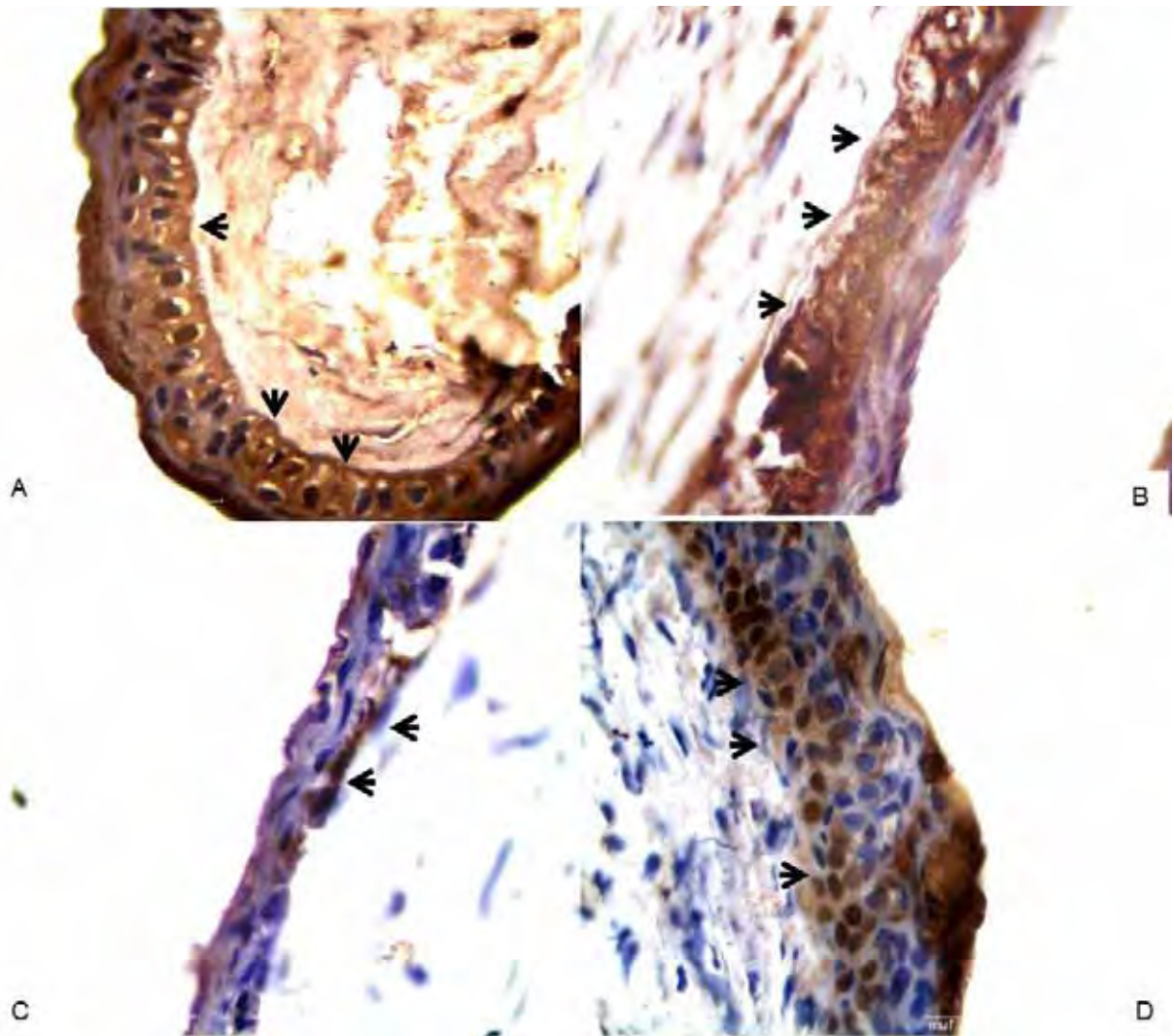
\* Teste Dunn ( $p < 0.05$ )



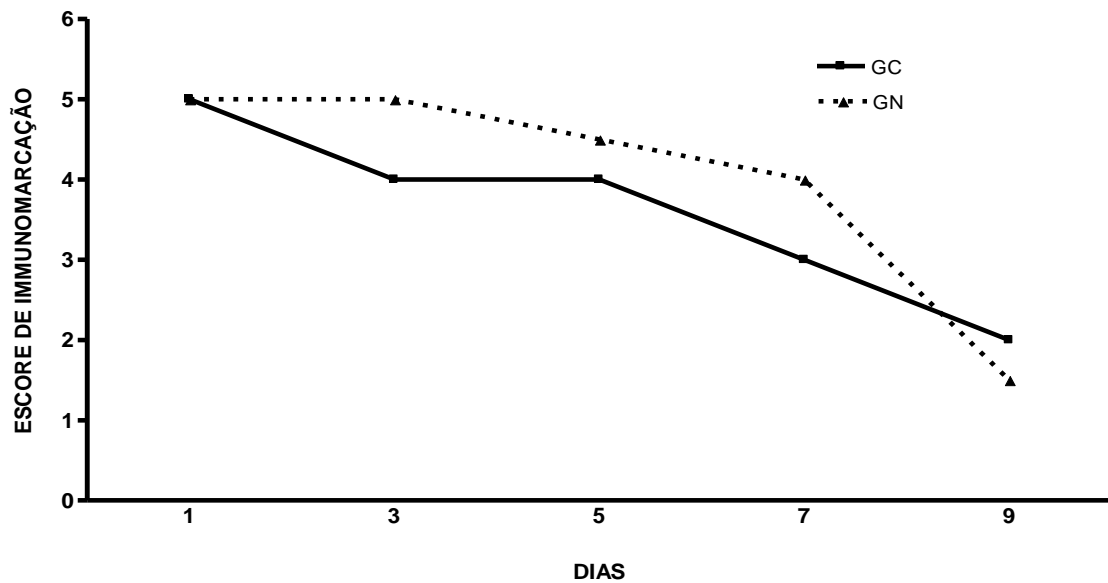
**Figura 8.** Mediana nos grupos controle (GC) e nalbupina (GN), quanto ao percentil de células mononucleares, em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2011

\* Teste Dunn ( $p < 0.05$ )

Relativamente à imunohistoquímica, observou-se imunomarcação da MMP-1 distribuída entre o espaço celular intersticial, nas células basais e externas, no estroma e sobre a lâmina basal em um 75% do campo avaliado, sem diferença significativa entre os grupos. O padrão que manteve até o quinto dia ( $p > 0,05$ ). No sétimo e nono dia, observou-se que a expressão da MMP-1 diminuiu em comparação com os dias anteriores ( $p < 0,01$ ) (Figura 9), ainda, sem apresentar diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 10). Nos momentos finais a MMP-1 se restringiu a uma distribuição epitelial basal. O grupo nalbufina apresentou imunomarcação mais expansiva, todavia sem diferença significativa relativamente ao grupo controle.



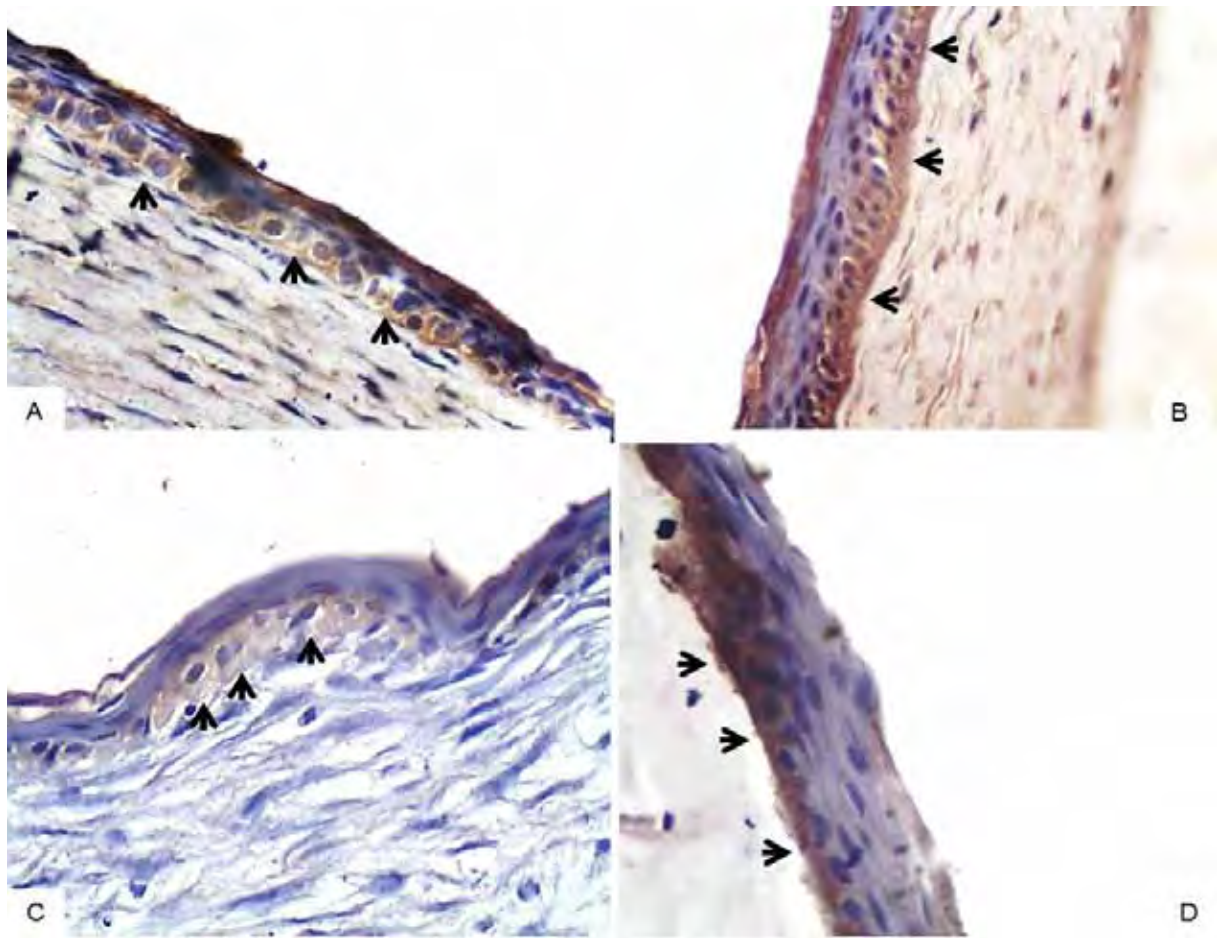
**Figura 9.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e C, imunomarcção da MMP-1 nas células basais (setas) e no estroma corneal. Em B e D, observar diminuição na imunomarcção da MMP-1 nas células basais. Polímero ligado a peroxidase. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2011



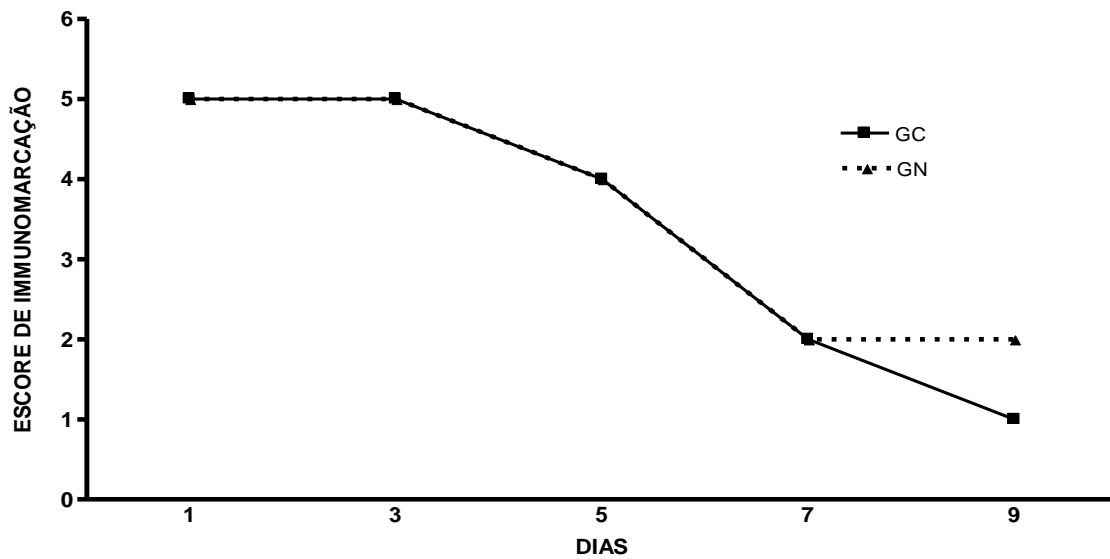
**Figura 10.** Mediana nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao escore de marcação da MMP-1 em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2011

\* Teste Dunn ( $p < 0.05$ )

No que concerne à MMP-9, tanto no GC quanto no GN, observou-se o mesmo padrão de marcação descrito para MMP-1, do primeiro ao quinto dia da avaliação ( $p > 0,05$ ) (Figura 11). Nos dias 1, 3 e 5 houve diferença significativa comparativamente aos dias 7 e 9 ( $p < 0,001$ ), onde a imunomarcação restringiu-se à lâmina basal e ao espaço intersticial em células epiteliais próximas a esta. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos períodos ( $p > 0,05$ ) (Figura 12).



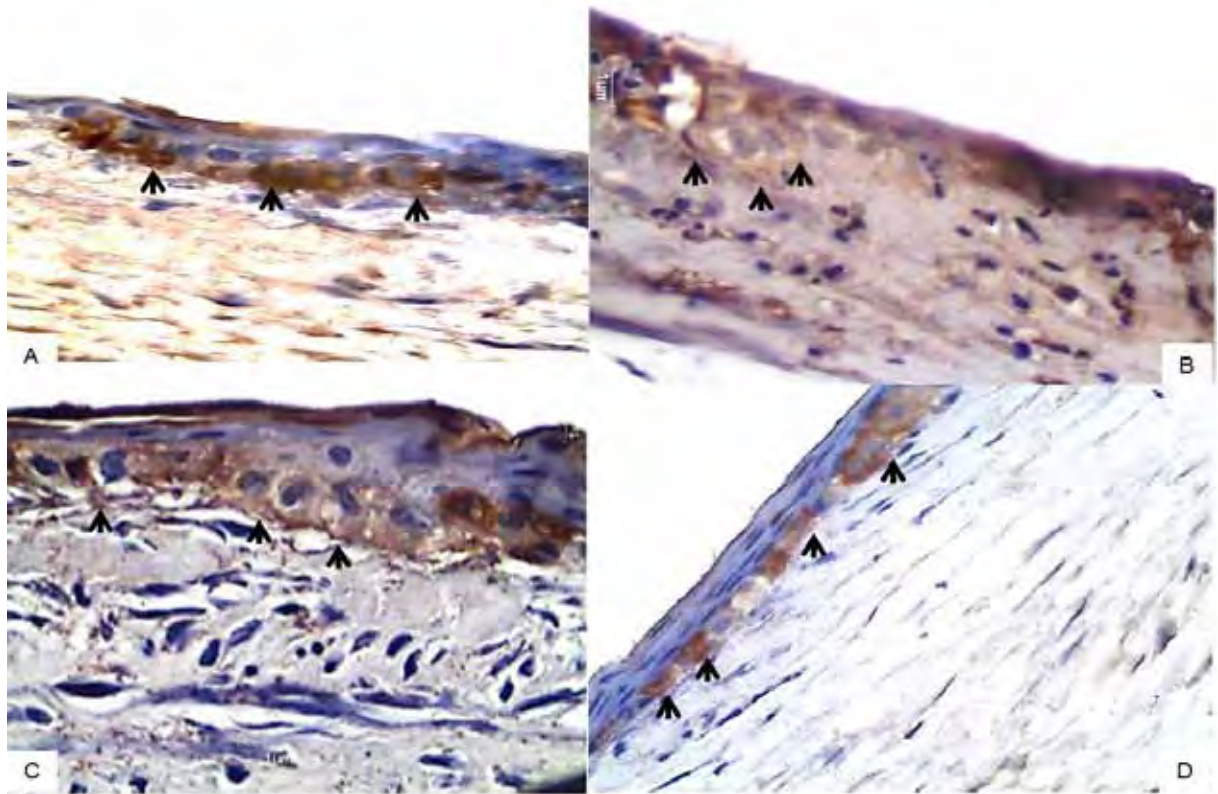
**Figura 11.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e C imunomarcção da MMP-9 em células basais (setas) e no estroma corneal. Em B e D, diminuição na imunomarcção de MMP-9 nas células basais. Polímero ligado a peroxidase. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2011



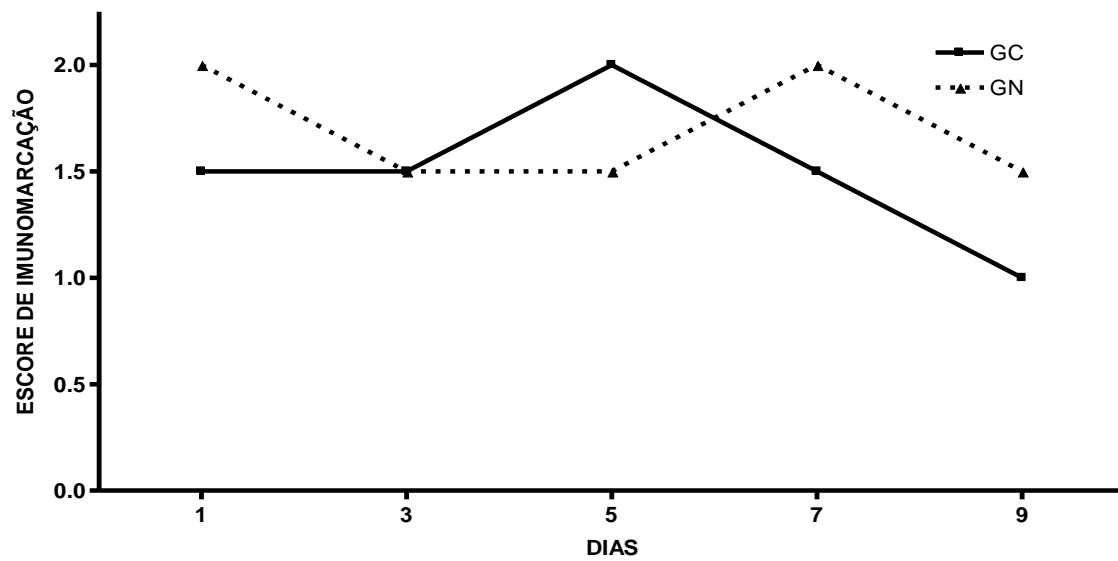
**Figura 12.** Média e desvio padrão nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao escore de marcação da MMP-9 em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2011

\* Teste Kruskal Wallis ( $p < 1,0$ )

Relativamente ao Fator de Crescimento opióide, observou-se, em todos os períodos, imunomarcação citoplasmática em células basais e parabasais (Figura 13). Não se observou diferença significativa nem entre os períodos e nem entre os grupos ( $p=1,0$ ) (Figura 14).



**Figura 13.** Fotomicrografias de córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, dos grupos controle (GC) (A e C) e nalbufina (GN) (B e D), decorridos 1 (A e B) e 9 (C e D) dias da ceratectomia lamelar. Observar, em A e B imunomarcagem do OGF nas células basais e intracitoplasmática (setas). Ausência do OGF no estroma. Em C e D, marcação de OGF em concentrações similares entre os grupos. Polímero ligado a peroxidase. Magnificação 400X. Jaboticabal, 2011



**Figura 14.** Mediana nos grupos controle (GC) e nalbufina (GN), quanto ao escore de marcação da OGF em córneas de coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 da ceratectomia lamelar. Jaboticabal, 2011

\* Teste Dunn ( $p < 0.05$ )



## 6. DISCUSSÃO

Os tempos de reepitelização nos grupos nalbufina e no grupo controle foram de  $7 \pm 1,79$  dias e de  $8,83 \pm 1,17$  dias, respectivamente. Não há, na literatura compulsada, estudos sobre os efeitos locais da nalbufina à 1%, quanto ao tempo de reparação corneal. Não se encontrou diferença significativa entre os grupos.

A reepitelização corneal desenvolve-se seguindo diferentes fases. Na primeira, decorre destruição de hemidesmossomos, síntese de proteínas do citoesqueleto e de laminínas que aderem temporariamente às células e à membrana basal. As células epiteliais se achatam e migram como um folheto intacto para cobrir a área lesada (AGRAWAL & TSAI, 2003). Decorridas, aproximadamente, 5 horas do insulto, inicia-se a proliferação das células desde a margem ulcerada, repovoando a área desnuda, a uma velocidade média de 60-80  $\mu\text{m}/\text{hora}$ . Ao final, hemidesmossomos e matriz extracelular são reconstituídos (AGRAWAL & TSAI, 2003).

Intercorrências podem alterar o tempo de reepitelização corneal. Citam-se a ação de fármacos, de conservantes (ex - cloreto de benzalcônio), de contaminação bacteriana secundária (*Pseudomona spp.*), expressão de metaloproteases (MMP-1, MMP-2, MMP-9) e a liberação de fatores do crescimento e de citocinas (Fator de Crescimento Opióide, Fator de Crescimento Epidermal, Interleucina-1, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ) (ZAGON et al., 1998; BEKENDAM et al., 2007; SAIKA, 2007; WANG et al., 2008; EPSTEIN et al., 2009; WILSON & ESPOSITO, 2009; CHANG et al., 2010; UEMATSU et al., 2010; WADA et al., 2010; YU et al., 2010; MÁRQUEZ et al., 2011).

Zagon et al. (2002) verificaram que a naltrexona, um antagonista opióide puro, acelerou a reepitelização de córneas de coelhos diabéticos. A diminuição do tempo de reepitelização decorreu dos efeitos na expressão do Fator de Crescimento Opióide ou [Met<sup>5</sup>] - Encefalina e de seu receptor. A nalbufina, um opióide agonista  $\kappa$ /antagonista  $\mu$ , foi avaliada na presente pesquisa visando-se a estudar se o seu efeito antagonista opióide poderia suscitar alterações no tempo de reepitelização. Donahue et al. (2011) reportaram que os efeitos da naltrexona sobre o OGF e o seu

receptor, e sobre a proliferação e a reparação teciduais, são dependentes da dose e da frequência das administrações.

Optou-se pela utilização da nalbufina à 1%, sem cloreto de benzalcônio, como conservante, para se evitarem os efeitos citotóxicos do conservante (EPSTEIN et al., 2009; UEMATSU et al., 2010). A toxicidade do cloreto de benzalcônio tem sido estudada, mas não se conhece em completude o seu mecanismo. Zhou et al. (2011) encontraram que ele diminui a fosforilação da  $\beta$ -catenina e aumenta a concentração total de  $\beta$ -catenina no citoplasma das células epiteliais, com ativação da via Wnt. Trata-se de via relacionada a eventos fisiológicos de diferenciação, desenvolvimento e proliferação celulares, assim como a eventos patológicos como inflamação e fibrose. Uematsu et al. (2010) relataram que quanto maior é o número de carbonos da região álcali na molécula do cloreto de benzalcônio, maior a sua toxicidade sobre as células corneais.

O pH da solução de nalbufina foi ajustado a 6,95. Para tal, empregou-se solução buffer tampão, sem que decorresse precipitação do princípio ativo. Tsai et al. (2010) encontraram que células epiteliais corneais humanas não sofrem efeitos citotóxicos, quando em meios com pH 5, comparativamente a outras de pH neutro (7,3). Fármacos que, para agir, necessitam de pH ácidos, podem se precipitar na superfície corneal ao contatarem com filme lacrimal, ensejando alterações na reepitelização e induzindo a perfurações (KONISHI et al., 1998; TSAI et al., 2010)

Peyman et al. (1994) reportaram a ocorrência de infecção após ceratectomias lamelares, em coelhos que não receberam antibioticoterapia profilática. Efeito imunossupressor decorrente do uso crônico de opióides foi relatado (BUDD, 2006; SHARP, 2006; STEIN & MECHELSKA, 2011). Empregou-se profilaticamente a tobramicina. A tobramicina mantém amplo espectro de ação contra microrganismos gram negativos e sua citotoxicidade, comparativamente à gentamicina e às fluoroquinolonas, é menor (NELSON et al., 1990; HENDRIX et al, 2001, TSAI et al., 2010, AYAKI et al., 2012).

Colírios à base de morfina, um agonista opióide puro, e seus efeitos sobre a reepitelização corneal têm sido discutidos. (STILES et al., 2003; FAKTOROVICH & BASBAUM, 2010; RIBEIRO et al., 2012). Ribeiro et al. (2012) reportaram aumento no diâmetro de áreas corneais trepanadas que receberam morfina localmente.

Pesquisas em cães com úlceras corneais e em seres humanos submetidos a cirurgias refrativas mostraram, todavia, que a morfina não alterou a reparação corneal (STILES et al., 2003; FAKTOROVICH & BASBAUM, 2010).

Previamente às ceratectomias lamelares, a avaliação quanto ao limiar de sensibilidade ao toque córneoal (LSC) não mostrou diferenças comparativamente e após a instilação de Nalbufina à 1%. Tais resultados não divergem dos reportados por Wotman & Utter (2010), em córneas de cavalos antes e após a utilização da Nalbufina à 1%.

O evento inflamatório que decorre da injúria corneal permite a ação do fármaco opióide, relativamente aos seus efeitos anti-nociceptivos, pelo incremento da síntese de seus receptores (ativação do STAT-6 pela interleucina 4 e a proteína 1), pelo aumento no transporte axonal (interleucina 1 $\beta$  aumenta o transporte de receptores opioides produzidos no gânglio da raiz dorsal até as terminações nervosas periféricas), condições do meio (prostaglandinas e baixo pH levam a união do opióide com a proteína P, aumentando a adenosina monofosfato cíclico neuronal) e pelo aumento das fibras nervosas sensitivas terminais, adjunto à quebra da barreira perineuronal (penetração do fármaco opióide e exposição dos receptores) (STEIN et al., 1988; WENK et al., 2003). Pelas observações, é fatível pensar que a nalbufina à 1% não enseja efeitos anti-nociceptivos em córneas hígdas.

Clark et al. (2011) não lograram êxito no controle da dor em pacientes da espécie canina submetidos a ceratectomia lamelar e tratados com nalbufina à 1%, Aquino et al. (2005) referiram que o limiar de sensibilidade ao toque córneoal em córneas sadias de cães aumenta decorridos 30 minutos de uma única instilação de nalbufina à 1%. Resultados díspares podem ser admitidos, considerando-se que os métodos de avaliação empregados não foram os mesmos. Aquino et al. (2005) avaliaram a sensibilidade corneal empregando o estesiômetro de Cochet-Bonett, enquanto Clark et al. (2011) o fizeram valendo-se de avaliação visual subjetiva e de diferentes escores, de consoante com comportamento dos pacientes após as ceratectomias.

Optou-se por se avaliar a região central da córnea, conquanto é a que mantém o maior quantitativo de inervação nociocéptica (RÓZSA et al., 1982). Em seres humanos, mostrou-se que o limiar de sensibilidade ao toque córneoal (LSC)

pode ser alterado por fatores como idade, ciclo hormonal, hora do dia, cor da íris, condições ambientais (temperatura e umidade), doenças endócrinas (diabete tipo 1 ou 2), fármacos, cirurgias refrativas, tipo de estesiômetro empregado na avaliação (Cochet-Bonett ou Belmonte), e doenças oculares como ceratites herpéticas e ceratoconjuntivite seca, além de outras (du TOIT et al., 2003; ACOSTA et al., 2005; BOURCIER et al., 2005; ACOSTA et al., 2006; GOLEBIEWSKI et al., 2008; GALLAR et al., 2010; NEIRA-ZALENTEIN et al., 2011).

Reportaram-se, em cães, alterações no LSC em pacientes acometidos por doenças como o diabete mellito, o glaucoma e em outros submetidos a procedimentos como a ciclotocoagulação a *laser* (WEIGT et al., 2002, CULLEN et al., 2005, BLOCKER et al., 2007).

O limiar de sensibilidade ao toque córneoal, na presente pesquisa, foi avaliado utilizando-se o estesiômetro de Cochet-Bonett. Trata-se de equipamento que produz estímulo mecânico na superfície ocular, pelo contato de um fio de nylon com a córnea. Considerando-se que o método possibilita estimular apenas mecano-nociceptores (20% do quantitativo de nociceptores da córnea), outras modalidades passaram a ser desenvolvidas, como o CRCERT-Belmonte, que permite a avaliação quanto a mecano-nociceptores e a receptores polimodais (GOLEBIEWSKI et al., 2008).

Golebiowski et al. (2011) compararam o Cochet-Bonett e o CRCERT-Belmonte. Os resultados foram inconclusivos, pelas diferenças quanto à modalidade do estímulo e ao modo de estimulação, fazendo pensar em possível mobilização de duas vias sensitivas diferentes. Na presente pesquisa, empregou-se o estesiômetro de Cochet-Bonett e não se encontraram diferenças significativas entre os grupos. Oportuna seria a utilização de mais de um tipo de estesiômetro para a melhor elucidação dos efeitos da nalbufina à 1% sobre a sensibilidade corneal.

Períodos de 30 segundos, entre cada estímulo, devem ser respeitados quando da realização da estesiometria, para diminuir-se as chances de adaptação dos nociceptores e para que haja a repolarização das fibras (GOLEBIEWSKI et al., 2008). Várias avaliações tiveram que ser realizadas para que se obtivessem resultados confiáveis. Em decorrência, induziu-se a uma possível “fadiga” dos receptores.

O uso de agonistas e de antagonistas opióides, pelas vias parenteral e local, tem mostrado efeitos sobre a inflamação (van LOON et al., 2010). Estudos avaliando a nalbufina, quanto aos seus efeitos sobre eventos inflamatórios, não foram encontrados. Nesta pesquisa, preparações de córneas de coelhos tratadas com nalbufina foram coradas pela hematoxilina & eosina, e avaliadas quanto à infiltração de polimorfonucleares e de mononucleares. Diferenças significativas entre tratados e controles não foram encontradas.

A existência de receptores opióides e sua ação sobre a inflamação, como a diminuição na produção de citocinas pro-inflamatórias, moléculas de adesão, edema e extravasamento de plasma, na proliferação e na quimiotaxia de diferentes fenótipos celulares do sistema imune (monócitos, linfócitos, macrófagos, granulócitos e neutrófilos) foi reportada em seres humanos, em macacos e em ratos (SHARP, 2006). Tratam-se de efeitos decorrentes da diminuição na liberação da substância P e de alterações na expressão do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, em neurônios terminais sensitivos periféricos (STEIN & MACHELSKA, 2011).

Estudos mostraram que opióides tópicos inibem fatores mitogênicos (substância P e neurocininas - 1 e - 2) de células da musculatura lisa, de ceratinócitos, de fibrócitos e de células endoteliais, alterando a reparação tecidual. Sabe-se que o contingente de células inflamatórias no local da lesão diminui e que o quantitativo de bactérias aumenta (ROOK et al., 2009, MARTIN et al., 2010). Rook, et al. (2009) encontraram que o efeito da morfina sobre o tempo de reparação tecidual depende do tempo em que a terapia é iniciada. Observaram alterações no tempo de reparação quando o tratamento fora iniciado imediatamente à lesão.

Alterações quanto à espessura do epitélio e o quantitativo tecido de granulação foram encontradas. No presente estudo, observou-se maior percentil de células mononucleares ao nono dia no GN, comparativamente ao GC. Flores et al. (1995), Roy et al. (2001) e Zeinalinejad et al. (2011) reportaram resultados similares em córneas tratadas com morfina, relativamente ao número de células mononucleares.

Antagonistas opióides têm sido estudados quanto aos efeitos sobre a reparação tecidual. Não se encontraram, na presente pesquisa, diferenças quanto ao tempo de reparação, tampouco alterações à histologia entre os grupos. A

naltrexona, um antagonista opióide, produz efeitos benéficos sobre a reparação tecidual (ZAGON et al., 2002).

Ceratites ulcerativas e lesões cutâneas decorrentes de diabetes melito são de difícil controle. O uso de naltrexona, nestes casos, tem mostrado resultados promissores (KLOCEK et al., 2007; KLOCEK et al., 2009; ABDELKADER et al., 2011; McLAUGHLIN et al., 2011). Efeitos similares foram encontrados na presente pesquisa, comparativamente aos de Klocek et al. (2007) e Klocek et al. (2009), que reportaram ausência de alterações quanto à morfologia corneal em coelhos diabéticos submetidas à ceratectomia e tratados com naltrexona. Zagon et al. (2002) e Donahue et al. (2011) relacionaram o evento à inibição, pela naltrexona, de peptídeos opióides endógenos (Fator de Crescimento Opióide) envolvidos no crescimento celular.

Metaloproteases da matrix extracelular (MMP) são endopeptidases dependentes do zinco, secretadas como pró-enzimas e ativadas no meio extracelular (BROOKS & OLLIVIER; 2004). Elas são classificadas em colagenasas, gelatinasas, estromalinas e MMP da matrix extracelular. Na córnea são sintetizadas pelos ceratócitos, pelas células epiteliais, pelos fibroblastos, pelos monócitos e pelos macrófagos (BROWN et al., 1991; FINI, 1999; WEBSTER & CROWE, 2006; OLLIVIER et al., 2007). A principal função está relacionada à remodelação e à reparação corneais (SIVAK & FINI, 2002; BROOKS & OLLIVIER, 2004). A manutenção e o reparação da matrix extracelular da córnea requerem equilíbrio entre síntese de componentes da matrix extracelular, a degradação e a remodelação. (OLLIVIER et al., 2007). A avaliação imunoistoquímica não permite a avaliação de formas ativas e inativas das MMP, porém o desenvolvimento de técnicas como a zimografia permitiriam esclarecer a existência de possíveis diferenças quanto a expressão destas MMP (SNOEK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005)

Inibidores teciduais de enzimas líticas, como o inibidor de protease alfa-1, a alfa-2 macroglobulina e inibidores de metaloproteases são encontrados no tecido corneal saudável e na lágrima (OLLIVIER et al., 2007). Não se encontraram estudos quanto à ação da nalbufina sobre a expressão das metaloproteases. Considerando-

se que fármacos podem produzir efeitos sobre a sua expressão, decidiu-se por se estudarem os possíveis efeitos da nalbufina à 1%.

Não foram encontradas alterações quanto à expressão de metaloproteases. Tratam-se de resultados que diferem dos encontrados por Chang et al. (2010), em que a morfina, antagonista opióide puro, produziu aumento na expressão das MMP em lesões cutâneas de ratos. Estudos realizados em outros tecidos e linhagens celulares têm mostrado efeito inibitório de MMP com a utilização de morfina (GACH et al., 2011).

Fini et al. (1996) e Ye & Azar (1998), ao produzirem lesões corneais em ratos, em cães e em seres humanos, respectivamente, encontraram que as MMP se expressavam notadamente na membrana basal e no estroma superficial. Resultados similares foram encontrados na presente pesquisa, relativamente ao padrão de imunomarcação para a MMP-1 e para a MMP-9. Mulholland et al. (2005) encontraram imunomarcação de MMP somente na região subepitelial.

À imunistoquímica, não se distinguiram diferenças significativas quanto à imunomarcação para a metaloprotease-1 e para a metaloprotease-9 entre os grupos. Verificou-se diminuição ao sétimo e nono dias, comparativamente aos outros períodos. O tempo de reepitelização não divergiu entre os grupos. Tais achados corroboram com os de Ollivier et al. (2004), de Mulholland et al. (2005) e de Wang et al. (2008).

O Fator de Crescimento Opióide (OGF) ou [Met5] Encefalina é um peptídeo natural endógeno encontrado em diferentes tecidos do corpo, que interage com o receptor zeta ( $\zeta$ ) ou OGF<sub>r</sub> (ZAGON et al., 1995, ZAGON et al., 2003). Esta relacionada a processos fisiológicos de remodelação e de reparação teciduais (ZAGON et al., 1995). Cheng et al. (2009) observaram que a sua ação sobre a proliferação celular deve-se à ativação de cinases inibitórias dependentes de ciclina. Robertson & Andrew (2003) e Zagon et al. (2003) reportaram a existência de OGF em córneas sadias de coelhos, de cães, de gatos e de cavalos. No presente estudo, encontrou-se que a imunomarcação de OGF não divergiu entre os grupos.

Zagon et al. (2002) e McLaughlin et al. (2011) relataram que ao inibirem o OGF, pela aplicação local de naltrexona, o tempo de reparação tecidual diminuiu. Tratam-se de resultados que diferem dos obtidos no presente estudo, em que a

ação antagonista da nalbufina à 1% não permitiu alterar a sua expressão. Mesmo que sem diferença significativa, a media quanto no tempo de reparação no grupo tratado com nalbufina foi menor. Não há como confirmar, todavia, que tal tenha decorrido da ação da nalbufina sobre o OGF.

Donahue et al. (2011) encontraram que o efeito de antagonistas opióides sobre a expressão do OGF depende da dose e das frequências de aplicação. Doses elevadas aumentaram a proliferação celular e doses baixas induzem a efeitos inibitórios. Efeitos sobre a proliferação celular não foram encontrados na presente pesquisa.

Estudos desenvolvidos com modelos inflamatórios na cavidade abdominal demonstraram que a aplicação de morfina produz aumento nas concentrações de peptídeos opióides endógenos (CHADZINSKA et al. 2005). No presente estudo encontrou-se que a fração agonista da nalbufina não interferiu com a expressão de peptídeos endógenos (OGF).



## **7. CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos com a pesquisa, na forma como ela fora concebida, é factível admitir que a aplicação local de nalbufina à 1% não ensejou analgesia corneal em coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco, que passaram por ceratectomia lamelar; e que a substancia não alterou a reparação epitelial da córnea, a expressão das metaloproteases-1, -9 e do Fator de Crescimento Opióide.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELKADER, H.; PATEL, D.V.; MCGHEE, C.N.J.; ALANY, R.G. New therapeutic approaches in the treatment of diabetic keratopathy: a review. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 39, n. 3, p. 259-270, 2011

ACOSTA, M.C.; BERENQUER-RUIZ, L.; GARCÍA-GÁLVEZ, A.; PEREA-TORTOSA, D.; GALLAR, J.; BELMONTE, C. Changes in mechanical, chemical, and thermal sensitivity of the cornea after topical application of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 1, p. 282-286, 2005

ACOSTA, M.C.; ALFARO, M.L.; BORRÁS, F.; BELMONTE, C.; GALLAR, J. Influence of age, gender and iris color on mechanical and chemical sensitivity of the cornea and conjunctiva. **Experimental Eye Research**, v. 83, n. 4, p. 932-938, 2006

ACOSTA, M.C.; LUNA, C.; GRAFF, G.; MESEGUER, V.M.; VIANA, F.; GALLAR, J.; BELMONTE, C. Comparative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nepafenac on corneal sensory nerve fibers responding to chemical irritation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 1, p. 182-188, 2007

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

ANDREW, S.E. Immune-mediated canine and feline keratitis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 38, n. 2, p. 269-290, 2008

AQUINO, S.; van der WOERDT, A.; EATON, J.S. The effect of topical nalbuphine on corneal sensitivity in normal canine eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n.6, p.437-450, 2005

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

AYAKI, M.; IWASAWA, A.; NIWANO, Y. In vitro assessment of the cytotoxicity of six topical antibiotics to four cultured ocular surface cell lines. **Biocontrol Science**, v. 17, n. 2, p. 93-99, 2012

BALL, I.M.; SEABROOK, J.; DESAI, N.; ALLEN, L.; ANDERSON, S. Dilute proparacaine for the management of acute corneal injuries in the emergency department. **Canadian Journal of Emergency Medicine**, v. 12, n. 5, p. 389-396, 2010

BARROS, L.F.; BARROS, P.S.; RÖPKE, C.D.; SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.; BARROS, S.B.; BELFORT JR, R. Dose-dependent in vitro inhibition of rabbit corneal

matrix metalloproteinases by an extract of *Pothomorphe umbellata* after alkali injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, n. 8, p. 1129-1132, 2007

BEKENDAM, P.D.; NARVÁEZ, J.; AGARWAL, M. Case of corneal melting associated with the use of topical nepafenac. **Cornea**, v. 26, n. 8, p. 1002-1003, 2007

BELMONTE, C.; ACOSTA, M.C.; SCHMELZ, M.; GALLAR, J. Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO<sub>2</sub> esthesiometer. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, p. 513-519, 1999

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

BENÍTEZ-DEL-CASTILLO J.M.; DEL RIO, T.; IRADIER, T.; HERNÁNDEZ, J.L.; CASTILLO, A.; GARCIA-SANCHEZ, J.  
Decrease in tear secretion and corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis. **Cornea**, v. 20, n. 1, p. 30-32, 2001

BENÍTEZ-DEL-CASTILLO, J.M.; ACOSTA, M.C.; WASSFI, M.A.; DÍAZ-VALLE, D.; GEGÚNDEZ, J.A.; FERNANDEZ, C.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J. Relation between Corneal Innervation with Confocal Microscopy and Corneal Sensitivity with Noncontact Esthesiometry in Patients with Dry Eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 1, p. 173-181, 2007

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

BLEBEA, J.; MAZO, J.E.; KIHARA, T.K.; VU, J.; MCLAUGHLIN, P.J.; ATNIP, R.G.; ZAGON, I.S. Opioid growth factor modulates angiogenesis. **Journal of Vascular Surgery**. v. 32, n. 2, p. 364-73, 2000

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

BORKOWSKI, R.; KARAS, A.Z. Sedation and anaesthesia of pet rabbits. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 44-49, 1999

BOURCIER, T.; ACOSTA, M.C.; BORDERIE, V.; BORRÁS, F.; GALLAR, J.; BURY, T.; LAROCHE, L.; BELMONTE, C. Decreased corneal sensitivity in patients with dry eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 7, p. 2341-2345, 2005

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

BROWN, D.; CHWA, M.; ESCOBAR, M.; KENNEY, M.C. Characterization of the major matrix degrading metalloproteinase of human corneal stroma. Evidence for an enzyme/inhibitor complex. **Experimental Eye Research**, v. 52, n. 1, p. 5-16, 1991

BUDD, K. Pain management: is opioid immunosuppression a clinical problem?. **Biomedicina & Pharmacotherapy**, v. 60, n. 7, p. 310-317, 2006

CALENDA, E.; RETOUT, A.; MURAINÉ, M. L'anesthésie péribulbaire pour le contrôle de la douleur per et postopératoire au cours des énucléations ou eviscerations Trente et un cas. **Journal Français D'ophtalmologie**, v.22, n.4, p.426-430, 1999

CALENDA, E.; MURAINÉ, M.; QUINTYN, J.C.; BRASSEUR, G. Sub-Tenon infiltration or classical analgesic drugs to relieve postoperative pain. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.32, n.2, p.154–158, 2004

CHADZINSKA, M.; SCISLOWSKA-CZARNECKA, A.; PIERZCHALA-KOZIEC, K.; PLYTYCZ, B. Met-enkephalin involvement in morphine-modulated peritonitis in swiss mice. **Mediators Inflammation**, v. 9, n. 2, p. 112-117, 2005

CHANG, J.H.; HAN, K.Y.; AZAR, D.T. Wound healing fibroblasts modulate corneal angiogenic privilege: interplay of basic fibroblast growth factor and matrix metalloproteinases in corneal angiogenesis. **Japan Journal of Ophthalmology**, v. 54, n. 3, p. 199-205, 2010

CHANG, P.J.; CHEN, M.Y.; HUANG, Y.S.; LEE, C.H.; HUANG, C.C.; LAM, C.F.; TSAI, Y.C. Morphine enhances tissue content of collagen and increases wound tensile strength. **Journal of Anesthesiology**, v. 24, n. 2, p. 240-246, 2010

CHENG, F.; MCLAUGHLIN, P.J.; VERDERAME, M.F.; ZAGON, I.S. The OGF-OGFr axis utilizes the p16INK4a and p21Waf1/Cip1 pathways to restrict normal cell proliferation. **Molecular Biology of Cell**, v. 20, n. 1, p. 319–327, 2009

CLARK, J.S.; BENTLEY, E.; SMITH, L.J. Topical nalbuphine or oral tramadol as analgesics for corneal pain in dogs: a pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, n. 6, p. 358-364, 2011

COCHET, P.; BONNET, R. L'esthésie cornéenne. Sa mesure clinique. Ses variations physiologiques et pathologiques. **La Clinique Ophtalmologique**, v. 4, p. 3–27, 1960

COUSEN, P.; CACKETT, P.; BENNETT, H.; SWA, K.; DHILLON, B. Tear production and corneal sensitivity in diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 21, n. 6, p. 371-373, 2007

COUTURE, S.; DOUCET, M. MOREAU, M. CARRIER, M. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.9, n.3, p.157-164, 2006

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

DANIELS, J.T.; GEERLING, G.; ALEXANDER, R.A.; MURPHY, G.; KHAW, P.T.; SAARIALHO-KERE, U. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 6, p. 653-664, 2003

DONAHUE, R.N.; McLAUGHLIN, P.J.; ZAGON, I.S. Low-dose naltrexone targets the opioid growth factor – opioid growth factor receptor pathway to inhibit cell proliferation: mechanistic evidence from a tissue culture model. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 9, p. 1036-1050, 2011

DONNENFELD, E.D.; HOLLAND, E.J.; DURRIER, D.S.; RAIZMAN, M.B. Double-masked study of the effects of nepafenac 0.1% and ketorolac 0.4% on corneal epithelial wound healing and pain after photorefractive keratectomy. **Advances in Therapy**, v. 24, n. 4, p. 852-862, 2007

du TOIT, R.; VEGA, J.A.; FONN, D.; SIMPSON, T. Diurnal variation of corneal sensitivity and thickness. **Cornea**, v. 22, n. 3, p. 205-9, 2003

EBRAHEM, Q.; CHAURASIA, S.S.; VASANJI, A.; QI, J.H.; KLENOTIC, P.A.; CUTLER, A.; ASOSINGH, K.; ERZURUM, S.; ANAND-APTE, B. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization in vivo. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 1, p. 496-503, 2010

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

FAKTOROVICH, E.G.; BASBAUM, A.I. Effect of topical 0.5% morphine on postoperative pain after photorefractive keratectomy. **Journal of Refractive Surgery**, v. 26, n. 12, p. 934-941, 2010

FEIZ, V.; OBERG, T.J.; KURZ, C.J.; MAMALIS, N.; MOSHIRFAR, M. Nepafenac-associated bilateral corneal melt after photorefractive keratectomy. **Cornea**, v. 28, n. 8, p. 948-50, 2009

FINI, M.E. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 18, n. 4, p. 529-551, 1999

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

FLACH, A.J. Corneal melts associated with topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Transactions of the American Ophthalmological Society**. v. 99, p.205-210, 2001

FLORES, L.R.; WAHL, S.M.; BAYER, B.M. Mechanisms of morphine-induced immunosuppression: effect of acute morphine administration on lymphocyte trafficking. **The Journal of Pharmacology Experimental and Therapy**, v. 272, n. 3, p. 1246–1251, 1995

GACH, K.; SZEMRAJ, J.; WYRĘBSKA, A.; JANECKA, A. The influence of opioids on matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion and mRNA levels in MCF-7 breast cancer cell line. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 2, p. 1231-1236, 2011

GALLAR, J.; TERVO, T.M.; NEIRA, W.; HOLOPAINEN, J.M.; LAMBERG, M.E.; MIÑANA, F.; ACOSTA, M.C.; BELMONTE, C. Selective changes in human corneal sensation associated with herpes simplex virus keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 9, p. 4516-4522, 2010

GEAR, R.W.; MIASKOWSKI, C.; GORDON, N.C.; PAUL, S.M.; HELLER, P.H.; LEVINE, J.D. Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men. **Nature Medicine**. v. 2, n. 11, p. 1248-1250, 1996

GEAR, R.W.; MIASKOWSKI, C.; GORDON, N.C.; PAUL, S.M.; HELLER, P.H.; LEVINE, J.D. The kappa opioid nalbuphine produces gender- and dose-dependent analgesia and antianalgesia in patients with postoperative pain. **Pain**, v. 83, n. 2, p. 339-345, 1999

GELATT, K.N. Veterinary ophthalmology. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 4ed, 2007, p.37-182

GICQUEL, J.J. Management of ocular surface chemical burns. **British Journal of Ophthalmology**, v. 95, n. 2, p. 159-166, 2011

GLANVILLE, J.N. Nalbuphine hydrochloride (Nubain, DuPont) as premedication for radiological procedures. **Clinical Radiology**, v. 42, n. 3, p. 212-213, 1990

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

GOLEBIEWSKI, B.; PAPAS, E.B.; STAPLETON, F. Factors affecting corneal and conjunctival sensitivity measurement. **Optometry and Visual Science**, v. 85, n. 4, p. 241-246, 2008

GOLEBIEWSKI, B.; PAPAS, E.; STAPLETON, F. Assessing the sensory function of the ocular surface: implications of use of a non-contact air jet aesthesiometer versus the Cochet-Bonnet aesthesiometer. **Experimental Eye Research**, v. 92, n. 5, p. 408-413, 2011

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

GOULD, D. Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 5, p. 333-346, 2011

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

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

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

HOSKIN, P.J.; HANKS, G.W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, v. 41, n. 3, p. 326-344, 1991

IOANNIDIS, A.S.; ZAGORA, S.L.; WECHSLER, A.W. A non-healing corneal ulcer as the presenting feature of type 1 diabetes mellitus: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 5, n. 1, p. 539, 2011

JONSSON, R.; VOGELSANG, P.; VOLCHENKOV, R.; ESPINOSA, A.; WAHRENHERLENIUS, M.; APPEL, S. The complexity of Sjögren's syndrome: novel aspects on pathogenesis, **Immunology Letters**, v. 141, n. 1, p. 1-9, 2011

KHALIFA, Y.M.; MIFFLIN, M.D. Keratitis and corneal melt with ketorolac tromethamine after conductive keratoplasty. **Cornea**, v. 30, n. 4, p. 477-478, 2011

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

KLOCEK, M.S.; SASSANI, J.W.; MCLAUGHLIN, P.J.; ZAGON, I.S. Topically applied naltrexone restores corneal reepithelialization in diabetic rats. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapy**, v. 23, n. 2, p. 89-102, 2007

KLOCEK, M.S.; SASSANI, J.W.; MCLAUGHLIN, P.J.; ZAGON, I.S. Naltrexone and insulin are independently effective but not additive in accelerating corneal epithelial healing in type I diabetic rats. **Experimental Eye Research**, v. 89, n. 5, p. 686-692, 2009

KONISHI, M.; YAMADA, M.; MASHIMA, Y. Corneal ulcer associated with deposits of norfloxacin. **American Journal of Ophthalmology**, v. 125, n. 2, p. 258-260, 1998

KSHIRSAGAR, S.; GEAR, R.; LEVINE, J.; VEROTTA, D. A mechanistic model for the sex-specific response to nalbuphine and naloxone in postoperative pain. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, n. 35, v. 1, p. 69-83, 2008

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

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

LIAO, C.C.; CHANG, C.S.; TSENG, C.H.; SHEEN, M.J.; TSAI, S.C.; CHANG, Y.L.; WONG, S.Y. Efficacy of intramuscular nalbuphine versus diphenhydramine for the prevention of epidural morphine-induced pruritus after cesarean delivery. **Chang Gung Medical Journal**, v. 34, n. 2, p. 172-178, 2011

LIN, J.C.; RAPUANO, C.J.; LAISBON, P.R.; EAGLE, R.C. Jr.; COHEN, E.J. Corneal melting associated with the use of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs after ocular surgery. **Archives of Ophthalmology**, v. 118, n. 8, p. 1129-1132, 2000

LOMAS, L.M.; BARRETT, A.C.; TERNER, J.M.; LYSLE, D.T.; PICKER, M.J. Sex differences in the potency of  $\kappa$  opioids and mixed-action opioids administered systemically and at the site of inflammation against capsaicin-induced hyperalgesia in rats. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 273-285, 2007

MCLAUGHLIN, P.J.; POTHERING, C.A.; IMMONEN, J.A.; ZAGON, I.S. Topical treatment with the opioid antagonist naltrexone facilitates closure of full-thickness wounds in diabetic rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 10, p. 1122-1132, 2011

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



MÁRQUEZ, E.B.; DE ORTUETA, D.; ROYO, S.B.; MARTÍNEZ-CARPIO, P.A. Epidermal growth factor receptor in corneal damage: update and new insights from recent reports. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 7-14, 2011

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

MASUDA, I.; MATSUO, T.; OKAMOTO, K.; MATSUSHITA, K.; OHTSUKI, H. Two cases of corneal perforation after oral administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: oral NSAID-induced corneal damage. **European Journal of Ophthalmology**, v. 20, n. 2, p. 454-456, 2010

MINAI, F.N.; KHAN, F.A. A comparison of morphine and nalbuphine for intraoperative and postoperative analgesia. **Journal Pakistan Medical Association**. v. 53, n. 9, p. 391-6, 2003

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

MOYAO-GARCÍA, D.; HERNÁNDEZ-PALACIOS, J.C.; RAMÍREZ-MORA, J.C.; NAVA-OCAMPO, A.A. A pilot study of nalbuphine versus tramadol administered through continuous intravenous infusion for postoperative pain control in children. **Acta Biomedica**, v. 80, n. 2, p. 124-130, 2009

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

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

MURPHY, P.J.; PATEL, S.; MARSHALL, J. A new non-contact corneal aesthesiometer (NCCA). **Ophthalmic & Physiology Optics**, v. 16, n. 2, p. 101-107, 1996

NEIRA-ZALENTEIN, W.; HOLOPAINEN, J.M.; TERVO, T.M.; BORRÁS, F.; ACOSTA, M.C.; BELMONTE, C.; GALLAR, J. Corneal sensitivity in diabetic patients subjected to retinal laser photocoagulation. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 52, n. 8, p. 6043-6049, 2011

NELSON, J.D.; SILVERMAN, V.; LIMA, P.H.; BECKMAN, G. Corneal epithelial wound healing: a tissue culture assay on the effect of antibiotics. **Current Eye Research**, v. 9, n. 3, p. 277-285, 1990

NIESSEN, S.J.; EASTWOOD, J.; SMYTH J.B.; CHERUBINI, G.B. Five cases of canine dysautonomia in England (2004 to 2006). **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 346-352, 2007

OLLIVIER, F. J.; BROOKS, D. E.; KALLBERG, M.E.; KOMAROMY, A.M.; LASSALINE, M.E.; ANDREW, S.E.; GELATT, K.N.; STEVENS, G.R.; BLALOCK, T.D.; van SETTEN, G.B.; SCHULTZ, G.S. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 9, p. 1081-1087, 2003

OLLIVIER, F. J.; BROOKS, D. E.; van SETTEN, G. B.; SCHULTZ, G.S.; GELATT, K.N.; STEVENS, G.R.; BLALOCK, T.D.; ANDREW, S.E.; KOMAROMY, A.M.; LASSALINE, M.E.; KALLBERG, M.E.; CUTLER, T.J. Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 6, p. 397-405, 2004

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 preclear tear film. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 199-206, 2007

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

PHARMAKAKIS, N.M.; KATSIMPRIS, J.M.; MELACHRINO, M.P.; KOLIOPOULOS, J.X. Corneal complications following abuse of topical anesthetics. **European Journal of Ophthalmology**, v. 12, n. 5, p. 373-378, 2002

RENNER, R.M.; JENSEN, J.T.; NICHOLS, M.D.; EDELMAN, A.B. Pain control in first-trimester surgical abortion: a systematic review of randomized controlled trials. **Contraception**, v. 81, n. 5, p. 372-388, 2010

REVIGLIO, V.E.; RANA, T.S.; LI, Q.J.; ASHRAF, M.F.; DALY, M.K.; O'BRIEN, T.P. et al. Effects of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**; v. 29, n. 5, p. 989-997, 2003

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

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

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

ROSENWASSER, G.O.; HOLLAND, S.; PFLUGFELDER, S.C.; LUGO, M.; HEIDEMANN, D.G.; CULBERTSON, W.W.; KATTAN, H. Topical anesthetic abuse. **Ophthalmology**, v. 97, n. 8, p. 967-972, 1990

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

ROY, S.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUMANDEEP, S.; CHARBONEAU, R.; WANG, J.; MELNYK, D.; BEILMAN, G.J.; VATASSERY, R.; BARKE, R.A. Morphine directs T cells toward T(H2) differentiation. **Surgery**, v. 130, n. 2, p. 304–309, 2001

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

SAIKA S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. **Cornea**, v. 26, n. 9, suplemento 1, p. 70-74, 2007

SHARP, B.M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 20, n. 1, p. 9–14, 2006

SMITH, M.A.; FRENCH, A.M. Age-related differences in sensitivity to the antinociceptive effects of kappa opioids in adult male rats. **Psychopharmacology**, v. 162, n. 3, p. 255-264, 2002

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

SNOEK-VAN BEURDEN, P.A.M.; VON DEN HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005

STACHS, O.; ZHIVOV, A.; KRAAK, R.; HOVAKIMYAN, M.; WREE, A.; GUTHOFF, R. Structural functional correlations of corneal innervation after LASIK and penetrating keratoplasty. **Journal of Refractive Surgery**, v. 26, n. 3, p. 159-167, 2010

STAPLETON, F.; TAN, M.E.; PAPAS, E.B.; EHRMANN, K.; GOLEBIEWSKI, B.; VEGA, J.; HOLDEN, B.A. Corneal and conjunctival sensitivity to air stimuli. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, p. 1547-1551, 2004

STEIN, C.; MACHELSKA H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. **Pharmacology Reviews**, v. 63, n. 4, p. 860-881, 2011

STEIN, C.; MILLAN, M.J.; YASSOURIDS, A.; HERZ, A. Antinociceptive effects of mu- and kappa- agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 255-264, 1988

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

STERN, M.E.; GAO, J.; BEUERMAN, R.W.; FARLEY, W.; ZHUO, L.; MCDONNELL, P.J.; PFLUGFELDER, S.C. Effects of Fourth-Generation Fluoroquinolones on the Ocular Surface, Epithelium, and Wound Healing. **Cornea**, v. 25, n. 9, p. S12-S24, 2006

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

STRUBBE, D.T.; BROOKS D.E.; SCHULTZ G.S.; WILLIS-GOULET H; GELATT K.N.; ANDREW S.E.; KALLBERG M.E.; MACKAY E.O.; COLLANTE W.R.; Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, n. 2-3, p. 111-119, 2000

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**, v. 35, n. 2, p. 131-137, 2000

TERZIS, J.K.; DRYER, M.M.; BODNER, B.I. Corneal neurotization: a novel technique for the anesthetic cornea. **Cornea**, v. 29, n. 7, p. 812-819, 2010

TOURTIER, J.P.; RAYNAUD, L.; MURAT, I.; GALL, O. Audit of protocols for treatment of paediatric burns in emergency departments in the Île de France. **Burns**, v. 36, n. 8, p. 1196-1200, 2010

TSAI, T.H.; CHEN, W.L.; HU, F.R. Comparison of fluoroquinolones: cytotoxicity on human corneal epithelial cells. **Eye**, v. 24, n. 5, p. 909-917, 2010

UEMATSU, M.; KUMAGAMI, T.; SHIMODA, K.; KUSANO, M.; TESHIMA, M.; SASAKI, H.; KITAOKA, T. Influence of alkyl chain length of benzalkonium chloride on acute corneal epithelial toxicity, **Cornea**, v. 29, n. 11, p. 1296-1301, 2010

van den BERG, A.A.; MONTOYA-PELAEZ, L.F.; HALLIDAY, E.M.; HASSAN, I.; BALOCH, M.S. Analgesia for adenotonsillectomy in children and young adults: a comparison of tramadol, pethidine and nalbuphine. **European Journal of Anaesthesiology**. v.16, n.3, p.186-194, 1999

van der WOERDT, A. Adnexal surgery in dogs and cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, n. 5, p. 284-290, 2004

van LOON, J.P.; de GRAUW, J.C.; van DIERENDONCK, M.; L'AMI, J.J.; BACK, W.; van WEEREN, P.R. Intra-articular opioid analgesia is effective in reducing pain and inflammation in an equine LPS induced synovitis model. **Equine Veterinary Journal**. v. 42, n. 5, p. 412-419, 2010

VAVRINKOVÁ, B.; OBORNÁ, L.; BINDER, T.; HORÁK, J. Nalbuphine in obstetrical analgesia. **Ceská Gynekologie**. v. 70, n. 3, p.180-183, 2005

WADA, S.; HOBBO, S.; NIWA, H. Ulcerative keratitis in thoroughbred racehorses in Japan from 1997 to 2008. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 2, p. 99-105, 2010

WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, L.; XUE, Q.; CUI, J.; QI, C. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China, **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, n. 3, p. 145-149, 2008

WANG, L.; PAN, Q.; XUE, Q.; CUI, J.; QI, C. Evaluation of matrix metalloproteinase concentrations in precorneal tear film from dogs with *Pseudomonas aeruginosa*-associated keratitis. **American Journal Veterinary Research**, v. 69, n. 10, p. 1341-1345, 2008

WEBSTER, N.L.; CROWE, S.M. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 5, p. 1052-1066, 2006

WEIGT, A.K.; HERRING, I.P.; MARFURT, C.F.; PICKETT, J.P.; DUNCAN, R.B.; WARD, D.L. Effects of cyclophotocoagulation with a neodymium: yttrium-aluminium-garnet laser, on corneal sensitivity, intraocular pressure, aqueous tear production, and corneal nerve morphology in eyes of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 6, p. 906-914, 2002

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

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

WILLIAMS, D.L.; KIM, J.Y. Feline entropion: a case series of 50 affected animals (2003-2008). **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 4, p. 221-226, 2009

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

WILLIAMS, K.K.; SHEPARD, A.R.; RICE, R.L.; MCCARTNEY, M.D.; WAX, M.B.; HIDDEMEN, J.W. Corneal wound healing in New Zealand White Rabbits following anterior keratectomy and treatment with moxifloxacin ophthalmic solution 0.5% or gatifloxacin ophthalmic solution 0.3%. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23. N. 6, p. 517-525, 2007

WILSON, S.E.; ESPOSITO, A. Focus on molecules: interleukin-1: a master regulator of the corneal response to injury. **Experimental Eye Research**, v. 89, n. 2, p. 124-125, 2009

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

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

YANG, K.S.; LIN, H.C.; MA, D.H.; CHEN, H.C.; TAN, H.Y.; HUANG, S.C.; LIN, K.K.; HSIAO, C.H. Ulcerative keratitis caused by Haemophilus influenza. **Cornea**, v. 25, n. 6, p. 701-704, 2006

YE, H.Q.; AZAR, D.T. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 39, n. 6, p. 913-921, 1998

YU, F.S.; YIN, J.; XU, K.; HUANG, J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 2-3, p. 229-235, 2010

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; ALLISON, G.; MCLAUGHLIN, P.J. Conserved expression of the opioid growth factor, [MetS]enkephalin, and the zeta ( $\zeta$ ) opioid receptor in vertebrate cornea. **Brain Research**. v. 671, p. 105-111, 1995

ZAGON, I.S.; SASSANI, J.W.; MCLAUGHLIN, P.J. Re-epithelialization of the rabbit cornea is regulated by opioid growth factor. **Brain Research**, v. 803, p. 61-68, 1998

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

ZAGON, I.S.; JENKINS, J.B.; SASSANI, J.W.; WYLIE, J.D.; RUTH, T.B.; FRY, J.L.; LANG, C.M.; MCLAUGHLIN, P.J. Naltrexone opioid antagonist, facilitates reepithelization of the cornea in diabetic rat. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 3055-3062, 2002

ZAGON, I.S.; RUTHA, T.B.; LEURE-DUPREEA, A.E.; SASSANIB, J.W.; MCLAUGHLIN, P.J. Immunoelectron microscopic localization of the opioid growth factorreceptor (OGFr) and OGF in the cornea. **Brain Research**, v. 967, p. 37–47, 2003

ZAGON, I.S.; JAGLOWSKI, J.R.; VERDERAME, M.F.; SMITH, J.P.; LEURE-DUPREE, A.E.; MCLAUGHLIN, P.J. Combination chemotherapy with gemcitabine and biotherapy with opioid growth factor (OGF) enhances the growth inhibition of pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 56, p. 510–520, 2005

ZAGON, I.S.; MCLAUGHLIN, P.J. Opioids and differentiation in human cancer cells. **Neuropeptides**. v. 39, p. 495–505, 2005

ZEINALINEJAD, H.; RAMEZANI, M.A.; SHAFIEE, M.; KARVAR, M.; MALEKPOUR-AFSHAR, R. Effect of opium dependency on burn healing in a rat model: an experimental study. **Medicine Principles Practice**, v. 20, n. 2, p. 147-151, 2011

ZHOU, Y.; LIU, Q.; ZHOU, T.; LIN, Z.; ZONG, R; LIU, Z; SUN, F; SHAO, Y; LIU, X.; MA, J.X.; LIU Z. Modulation of the canonical Wnt pathway by Benzalkonium Chloride in corneal epithelium. **Experimental Eye Research**, v. 93, n. 4, p. 355-362, 2011