

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

EFEITOS DA INSTILAÇÃO DE MORFINA NA
INFLAMAÇÃO OCULAR INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS.

Kethye Priscila Ortencio

Médica Veterinária

2013

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

EFEITOS DA INSTILAÇÃO DE MORFINA NA
INFLAMAÇÃO OCULAR INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS.

Kethye Priscila Ortencio

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

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

2013

O77e Ortencio, Kethye Priscila
Efeitos da Instilação de Morfina na Inflamação Ocular Induzida
Experimentalmente em Coelhos / Kethye Priscila Ortencio. --
Jaboticabal, 2013
viii, 44 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: José Luiz Laus
Banca examinadora: Alexandre Pinto Ribeiro, Paola Castro Moraes
Bibliografia

1. *Coelho*. 2. Morfina. 3. Naloxona. 4. Citocinas. 5 Uveites I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617.7:636.92

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Kethye Priscila Ortencio – nascida na cidade de São Bernardo do Campo, em 13 de outubro de 1981. Gradou-se em medicina veterinária na UNESP- Universidade Estadual Paulista – câmpus de Jaboticabal em dezembro de 2008. Realizou estágio no serviço de oftalmologia do hospital veterinário "Governador Laudo Natel" de fevereiro a dezembro de 2009. Foi bolsista FAPESP de treinamento técnico de dezembro de 2009 a dezembro de 2010, no serviço de oftalmologia do hospital veterinário "Governador Laudo Natel". Ingressou no programa de Pós- graduação em Cirurgia Veterinária na UNESP- Universidade Estadual Paulista – câmpus de Jaboticabal em março de 2011.

Dedicatória

A meu pai (*in memoriam*); que, com certeza, é um dos responsáveis por mais essa conquista e está feliz em qualquer lugar que esteja.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me confortou e me mostrou a luz no fim do túnel em todos os momentos difíceis em minha vida!

À minha família, que é meu esteio, minha mãe que sempre me apoiou em tudo e, principalmente, nos meus estudos de forma incondicional.

À minha avó, Maria, pelos momentos de oração a cada momento de aflição que eu passava. Agradeço às minhas irmãs, Kelly e Keila, por sempre me apoiarem e me consolarem nos telefonemas confusos.

À Keila, em especial, por ser a responsável pela escolha de minha profissão.

Agradeço às minhas companheiras inseparáveis, Pandora e Branca, que enxugaram minhas lágrimas de tristeza e de alegrias.

Agradeço ao professor Laus por me aceitar como orientada e proporcionar um aprendizado que vai muito além da oftalmologia, com sua filosofia de vida e suas frases do tipo: “da maneira como você chegar, será recebida”.

Aos colegas do serviço de oftalmologia, os que já passaram por lá, Juan, Leticia, Bianca, Alexandre (Dedo), Alexandre Andrade, Adriana Morales, Dúnia, Patrícia, permanecem Luciano, Luciana, Karina, Fabio, Ivan, Roberta Crivelaro, Roberta Renzo, Germana, Tiago, Camila (Bia), Alexandre (Antônio).

Às minhas amigas Juliana (remela), Roberta (titi-ti), Henriete (atrevida), Stela (Reba) que, mesmo não morando mais juntas, continuaram aturando minhas lamentações e loucuras; à Daniela (Braba) e Juliana Vitti Moro, mesmo não morando juntas, sempre estiveram ao meu lado, bastando um toque.

A todas as colegas de República “As Coyotes”, onde morei por oito anos e meio, porque, afinal, uma vez “Coyote”, sempre “Coyote”!

Aos moradores da república “Os Mimadinhos ou Os Gordinhos”: Ricardo, Huppes, Caio e Alexandre por esse ano de convivência com discussões, conversas, comidas e muito café.

Ao professor Tiago Mineo e a seus orientados, Arlindo Macedo Jr e Murilo Vieira da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia, pelo auxílio prestado à realização do ELISA.

À Cristália por manipular as soluções de Morfina e naloxona.

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido 2011/08734-8.

À CAPES pela bolsa de estudo a mim despendida.

Agradeço aos funcionários do HV, recepção, enfermagem, limpeza, farmácia, laboratório.

E, finalmente, aos coelhos que foram comprometidos com o desenvolvimento dessa pesquisa.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
2. JUSTIFICATIVA	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivos Gerais	5
3.2 Objetivos Específicos.....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
4.1 Aspectos Éticos.....	6
4.2 Animais.....	6
4.3 Procedimentos Anestésicos.....	6
4.4 Uveíte experimental	7
4.5 Flaremetria a “laser”.....	7
4.6 Grupos Experimentais e Protocolos Terapêuticos.....	7
4.7 Imunoensaio enzimático (ELISA).....	8
4.7.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	9
4.7.2 Interleucina 1-Beta (IL-1 β).....	9
4.7.3 Prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	9
4.7.4 Mieloperoxidase (MPO).....	10
4.8 Estatística.....	10
5. RESULTADOS	12
5.1 Flaremetria a “laser”.....	13
5.2 Imunoensaio Enzimático (ELISA).....	15
6. DISCUSSÃO.....	19
7. CONCLUSÃO.....	22
8. REFERÊNCIAS	23



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 014274/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Efeitos locais da morfina sob a expressão de citocinas e de mediadores inflamatórios, em coelhos da raça Nova Zelândia Branca com uveíte induzida**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Laus está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de Agosto de 2011.

Jaboticabal, 10 de Agosto de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

EFEITOS DA INSTILAÇÃO DE MORFINA NA INFLAMAÇÃO OCULAR INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM COELHOS.

RESUMO - Avaliou-se o efeito da instilação local de morfina 1% sobre a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), da interleucina-1 beta (IL-1beta), da prostaglandina E2 (PGE2) e da mieloperoxidase (MPO) e a turbidez do humor aquoso (flaremetria a laser) em olhos de coelhos com uveíte induzida por injeção intravítrea de endotoxina. Empregou-se 30 leporinos da raça Nova Zelândia Branco, separados em 5 grupos (n=6), a saber : basal, grupo controle (GC), grupo morfina (GM), grupo naloxona (GN), grupo morfina-naloxona (GMN). Sob anestesia dissociativa, injetou-se 0,1 mL, contendo 0,2 µg de endotoxina (parede celular de *Salmonella typhimurium*), na câmara vítrea do olho direito de cada animal para a indução da uveíte experimental. Para a avaliação, realizou-se a flaremetria a “laser” antes da injeção intravítrea de endotoxina (basal), e às 10 e 20 horas da indução da uveítes, ocasião em que os olhos tratados foram enucleados para a quantificação do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), da interleucina-1 beta (IL-1beta), da mieloperoxidase (MPO) e da prostaglandina E2 (PGE2) por ELISA. Os dados foram analisados estatisticamente, quanto contagem de fótons no humor aquoso (flaremetria a “laser”), aplicando-se análise de variância não paramétrica de Friedman, seguida do “post hoc test” de Dunn, ao nível mínimo de significância de $p > 0,05$ e quanto à quantificação das citocinas, utilizando-se Análise de Variância de via única, seguida pelo teste de Tukey, nas avaliações entre grupos. Considerou-se o nível mínimo de significância $p < 0,05$. Observou-se, após a indução da uveíte, elevação significativa no nível TNF-alfa e IL-1beta, comparativamente aos olhos basais ($p < 0,05$) em todos os tratamentos estudados (GC, GM, GN, GMN). A atividade da MPO apresentou uma elevação não significativa após a indução da uveíte. Os níveis dessas citocinas entre os grupos apresentaram-se similares, exceto na quantificação da PGE2, o qual apresentou variação significativa entre os grupos GM e GNM ($p < 0,05$). Com base nos resultados obtidos, considerando a maneira como a pesquisa fora concebida e as injunções do meio onde fora realizada, é possível admitir que a morfina não ofereceu ação anti-inflamatória sobre a expressão de citocinas e de mediadores inflamatórios estudados, quando utilizada localmente, por instilação, em olhos de leporinos da raça Nova Zelândia Branco, com uveíte induzida por injeção intravítrea de endotoxinas.

Palavras - chave: citocinas, coelho, flaremetria a “laser”, morfina, naloxona, uveíte

EFFECTS OF MORPHINE INSTILLATION OCULAR INFLAMMATION INDUCED IN RABBITS EXPERIMENTALLY.

ABSTRACT - To evaluate the effects of instillation of morphine 1% on the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin-1 beta (IL-1beta), prostaglandin E2 (PGE2) and myeloperoxidase (MPO) and the turbidity of aqueous humor (laser flaremetry) in the eyes of rabbits with uveitis induced by intravitreal injection of endotoxin. Were used 30 New Zealand White rabbits, separated into 5 groups (n = 6), as follows: healthy control group (CG), morphine group (GM), naloxone group (GN), morphine-naloxone group (GMN). Under dissociative anesthesia it was injected 0.1 mL containing 0.2 mg of endotoxin (cell wall of *Salmonella typhimurium*) in the vitreous of the right eye of each animal to induce experimental uveitis. For the evaluation, it was used laser flaremetry before intravitreal injection of endotoxin (baseline) and at 10 and 20 hours after the induction of uveitis, at which time the treated eyes were enucleated for the quantification of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin-1 beta (IL-1beta), mieloperoxidase (MPO) and prostaglandin E2 (PGE2) by ELISA. The data were treated statistically, the photon count in the aqueous humor (laser flaremetry), applying Friedman's nonparametric two-way analyses of variance test, then the Dunn's "post hoc test", the minimum level of significance was $p > 0.05$ and for quantification of cytokines using ANOVA one-way followed by Tukey test in ratings between groups. Considered the minimum level of significance $p < 0.05$. It was observed after induction of uveitis, significant increase in the level of TNF-alpha and IL-1beta compared to baseline eyes ($p < 0.05$) in all treatments (GC, GM, GN, GMN). The MPO activity showed a nonsignificant increase after induction of uveitis. The levels of these cytokines between groups presented similar except in the quantification of PGE2, which showed significant variation between groups GM and GNM ($p < 0,05$). Based on the results, considering the way the research was designed and the injunctions of where it carried out, it is possible to admit that morphine did not offer anti-inflammatory action on the expression of cytokines and inflammatory mediators studied, when use locally, by instillation into the eyes of New Zealand White rabbits with uveitis induced by intravitreal injection of endotoxin.

Keywords: cytokines, rabbit, flaremetria "laser", morphine, naloxone, uveitis

LISTA DE ABREVIATURAS

TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
IL-1 α	Interleucina um alfa
IL-1 β	Interleucina um beta
PGE ₂	Prostaglandina E2
MPO	Mieloperoxidase
LPS	Lipopolissacarideos 23
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
ARVO	“Association for Research in Vision and Ophtalmology”
mg	Miligrama
μ g	Micrograma
pg	Picograma
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
mm	Milímetros
VB	Valor basal
GC	Grupo controle
GM	Grupo morfina
GN	Grupo naloxona
GMN	Grupo morfina naloxona
NSB	“Non specific Binding”
TA	Atividade total
Blk	“Blank”
PBS	Solução tampão fosfato salino
rpm	Rotação por minuto
nm	Nanômetro
mU	Medida da atividade enzimática unidade internacional

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Blefaroespasma, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....12
- Tabela 2. Hiperemia conjuntival, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....12
- Tabela 3. Secreção, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....13
- Tabela 4. Quemose, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....13
- Tabela 5. Medianas, máximo e mínimo* relativas à quantificação da turbidez do humor aquoso (fótons/milissegundos), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, antes (basal) e decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....14

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Imagem fotográfica ilustrando a sequência de eventos após a enucleação em coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Em A, secção da esclera para retirada do botão córneoescleral; em B, botão córneoescleral; em C, separação da íris e do corpo ciliar por tração; em D íris e corpo ciliar em condições de acondicionamento. Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....8
- Figura 2. Mediana, máximo, mínimo e quartis (25 e 75%)* relativos à quantificação da turbidez do humor aquoso (fótons/milissegundos), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, antes (basal) e decorridas 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), com morfina (GM), com naloxona (GN) e com morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....14
- Figura 3. Nível de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) previamente a injeção de lipopolissacarídeo em olhos grupo controle (GC) e após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com salina (GP), com naloxona (GN), com morfina (GM) e com morfina e naloxona (MN), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....15
- Figura 4. Nível de interleucina 1-beta (IL-1 β) previamente a injeção de lipopolissacarídeo em olhos grupo controle (GC) e após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com solução salina (GP), com naloxona (GN), com morfina (GM) e com morfina e naloxona (MN), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....16.
- Figura 5. Nível prostaglandina E₂ (PGE₂) previamente a injeção de lipopolissacarídeo em olhos saudáveis (Saudável) e após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com salina (GC), com naloxona (GN), com morfina (GM) e com morfina e naloxona (MN), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....17
- Figura 6. Nível mieloperoxidase (MPO) previamente a injeção de lipopolissacarídeo em olhos saudáveis (Saudável) e após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com salina (GC), com naloxona (GN), com morfina (GM) e com morfina e naloxona (MN), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.....18

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O olho é constituído pelas túnicas fibrosa, vascular e nervosa (GUM, 1999). O trato uveal corresponde à porção vascular do bulbo do olho, sendo formado pela íris, corpo ciliar (úvea anterior) e coróide (úvea posterior). A úvea é responsável pela drenagem linfática e é partícipe da manutenção da homeostasia ocular (TEIXEIRA et al., 2009).

Define-se uveíte como a inflamação do trato uveal. A condição cursa com a maioria das doenças intraoculares, por ser a úvea vascularizada e contígua a outras estruturas do olho (COLLINS e MOORE, 1999). Os fatores causais podem ser exógenos, por trauma direto ou decorrente de cirurgias intraoculares. Podem, outrossim, ser secundários a ceratites ou a esclerites (van der WOERDT, 2001), a infecções (COLLINS e MOORE, 1999; MASSA et al., 2002; HONSHO et al., 2003; ORIÁ et al., 2004; BRITO et al., 2006), imunomediados (HONSHO et al., 2002; DENIS et al., 2003; GODOY et al., 2004; LAUS et al., 2004; CARTER et al., 2005) ou, ainda, a neoplasias (MASSA et al., 2002).

A inflamação da úvea anterior resulta na redução da secreção ativa do humor aquoso (SLATTER, 2005). Uveítes cursam com aumento da permeabilidade vascular e a participação direta de mediadores inflamatórios. A resposta aguda inicia-se com liberação de histamina e é mantida por mediadores como serotonina, plasmina, prostaglandinas e leucotrienos (TEIXEIRA et al., 2009). Dor, hiperemia conjuntival e injeção episcleral são considerados comuns (SLATTER, 2005).

O desequilíbrio entre proteínas e células na câmara anterior, associado a outros eventos clínicos, como pressão intraocular diminuída e miose, podem resultar em sequelas, incluindo sinéquias, catarata, glaucoma, endoftalmite e *phthisis bulbi* (GELATT e GELATT, 2001; van der WOERDT et al., 2001).

O diagnóstico da inflamação ocular é basicamente clínico e leva em consideração sinais como turbidez do humor aquoso ou “flare”, dilatação retardada ou incompleta da pupila após instilação de cicloplégicos e hipotensão ocular. Faculta-se a quantificação do “flare”, não obstante a sua importância (LEASURE et al., 2001).

O flarímetro a “laser” foi desenvolvido para possibilitar a quantificação não invasiva da turbidez do humor aquoso (SAWA et al., 1990). A contagem de fótons pela flarimetria a “laser” é factível na determinação da eficácia de diferentes anti-

inflamatórios utilizados em cães e em gatos, por apresentar forte correlação com a concentração de proteína total do humor aquoso (KROHNE et al., 1998; RANKIN et al., 2011).

Citocinas são proteínas que agem no sistema imune, direcionando leucócitos para os sítios de inflamação. Nas doenças oftálmicas, o papel das citocinas tem sido objeto de estudos (GONÇALVEZ et al., 2007). Elas podem ser separadas em duas categorias, dependendo de como são expressas, em constitutivas e em induzidas. As constitutivas são produzidas em diferentes tecidos e recrutam leucócitos, notadamente linfócitos. As citocinas induzidas (ou inflamatórias) são produzidas por diferentes células, em resposta a estímulos inflamatórios. Elas recrutam leucócitos para os sítios da inflamação (GONÇALVEZ et al., 2007). A regulação dos eventos é dependente do equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias. As últimas são detectáveis em indivíduos normais e as pró-inflamatórias apenas agem localmente em tecidos inflamados, sendo detectável em baixas concentrações em células saudáveis (MOURA et al., 2001).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é sintetizado por monócitos, por macrófagos, por neutrófilos, por mastócitos e por linfócitos T. No curso da inflamação, ele modula a infiltração de leucócitos, por favorecer a síntese de moléculas de adesão, de maturação e de manutenção de células dendríticas (OOI et al., 2006). Ademais, ele atua na ativação de macrófagos e direciona a resposta de linfócitos T auxiliar -1 (OOI et al., 2006). Reportou-se elevação na expressão gênica de TNF- α em uveítes anteriores imunomediadas e que tal mantinha correlação com o pico da inflamação (de KOSAK e VERWAERDE, 2002). Pinard et al. (2011) observaram um aumento não significativo estatisticamente na concentração de TNF- α no humor aquoso de cães, após a realização de paracentese. Em facectomias, por exemplo, a sua expressão encontra-se aumentada, decorridas 18 horas da cirurgia (TU et al., 2007).

As interleucinas-1 α e -1 β constituem a citocina pleiotrópica IL-1. Apesar de possuírem receptor próprio, sabe-se que há ligação inespecífica com outros receptores. As IL-1 α e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias, predominantemente derivadas de macrófagos ativados e, em menor quantitativo, de linfócitos B e de células endoteliais. A elevação nos níveis de IL-1 no humor aquoso mantém relação com níveis de metaloproteinases (EI-SHABRAWI et al., 2000). Pinard et al. (2011)

constatarem que TNF- α , NOS-2 e a metaloproteinase- 3 e 9 permaneceram com níveis não detectáveis por ELISA após a realização da paracentese.

As prostaglandinas (PGs) constituem-se nos mediadores químicos mais referenciados, relativamente à inflamação intraocular (DIZIEZYC et al., 1992; RIBEIRO et al., 2009; PINARD et al., 2011; GILMOUR e PAYTON, 2012). Doenças infecciosas, catarata, traumatismo, cirurgias oftálmicas, neoplasias e muitas outras condições ensejam a quebra da barreira hematoaquosa e a síntese de PGs (TEIXEIRA et al., 2009). Como a maioria dos eicosanóides, elas não se encontram pré-formadas. Quando as células são ativadas ou o ácido araquidônico é liberado da parede celular, as PGs são sintetizadas a partir das ciclo-oxigenases-1 e -2 e lançadas no espaço extracelular (COLLINS & MOORE, 1999). Ribeiro et al. (2009); Gilmour e Payton, (2012) reportaram que, em cães, a quantificação da inflamação intraocular é factível pela quantificação da PGE₂.

Há décadas os opióides são utilizados parenteralmente como analgésicos. Eles se ligam a receptores endógenos induzindo a efeitos antinociceptivos no sistema nervoso central. Dados sugerem que a sua aplicação local pode suscitar analgesia, por via neuroimune, dada a existência de receptores opióides em tecidos periféricos (STEIN et al., 1988; STEIN et al., 1989; WENK e HONDA, 1999; STILES et al., 2003; WENK et al., 2003; RIBEIRO et al., 2012). Eles são encontrados em pequeno quantitativo nos tecidos saudáveis e para que a sua síntese se intensifique, a inflamação deve estar presente (STILES et al., 2003; WENK et al., 2003).

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

Dortch-Canes e Russel (2007) observaram que a instilação de morfina reduziu a PIO em coelhos saudáveis e que o evento se deu por 5 minutos. Mostrou-se ativação de receptores *mu* e liberação de óxido nítrico na íris, ensejando dilatação vascular e aumento na patência da drenagem uveoescleral (DORTCH-

CANES e RUSSEL (2009). Reportou-se que a injeção intravítrea de morfina protegeu células retinianas de ratos em modelos de isquemia e de reperfusão (RIAZI-ESFAHANI et al., 2009). Husain et al. (2011) mostraram que a morfina reduziu níveis de TNF- α na retina, após injúria produzida por aumento da pressão intraocular.

A aplicação intra-articular de morfina foi capaz de reduzir níveis de PGE₂, de bradicinina e de leucócitos em equinos com sinovite experimental (van LOON et al., 2010); no mesmo estudo, a injeção intra-articular de morfina foi mais eficaz, comparativamente à aplicação sistêmica, no controle da inflamação (LINDEGAARD et al., 2010). No âmbito da oftalmologia, os efeitos da morfina sobre a PGE₂ ainda não foram esclarecidos em sua completude.

A naloxona é um antagonista opióide não seletivo que pode ser utilizado para reverter a ação da morfina, um agonista opióide seletivo de receptores opióides do tipo 3 (STAGNI, 2010). Seus efeitos, todavia, não são significantes, quando administrado a pacientes não pré-tratados com opióides. Metabolizada no fígado, sua meia-vida de eliminação é de, aproximadamente, uma hora (GOZZANI, 1994).

Relativamente aos métodos aplicados em oftalmologia experimental, para indução da inflamação intraocular, elenca-se a injeção intravítrea de lipopolissacarídeos (YANG et al., 1996, ISHIDA et. al. 2010, KANAI et.al 2010, WANG et al. 2011, XU et al., 2010). A infiltração de células inflamatórias tem início decorridas quatro horas da injeção e o seu máximo é atingido entre 18 e 24 horas da sua aplicação (YANG et al., 1996).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se que o uso local de opióides, notadamente da morfina, vem sendo praticado com o intuito de se controlar a dor em ceratites ulcerativas (RIBEIRO et al., 2012), indagou-se sobre as eventuais intercorrências da sua utilização, quanto à estabilidade da barreira hematoaquosa. Pesquisas demonstraram que a morfina inibiu a liberação de citocinas pró-inflamatórias após incisões cutâneas e que ela diminui a infiltração de leucócitos em córneas ulceradas com nitrato de prata (WENK et al., 2003; CLARK et al., 2007). Ademais, que ela elevou o quantitativo de metaloproteinases, sem alterar os níveis de interleucina-10,

em córneas que passaram por ceratectomia lamelar (RIBEIRO et al., 2012). A administração intraperitoneal de morfina em ratos com hipertensão ocular induzida protegeu células ganglionares da retina pela inibição da produção de TNF- α . (HUSAIN et al. 2012). Estudos prévios realizados pela equipe executora deste projeto mostraram, empregando-se a flarimetria a “laser”, que, após paracentese da câmara anterior, a morfina elevou o quantitativo de proteínas do humor aquoso (KOBASHIGAWA et al.,2012).

Em face do exposto e considerando-se que a morfina ensejou analgesia em ceratites ulcerativas e no pós-operatório de cirurgias refrativas, condições que cursam com a quebra da barreira hematoaquosa e conseqüente elevação na expressão de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, estudaram-se os efeitos da substância em olhos de coelhos com uveíte induzida por injeção intravítrea de endotoxinas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar - se o efeito anti-inflamatório da morfina 1%, em instilação local sobre uveíte induzida em coelhos da raça Nova Zelândia Branco.

3.2 Objetivos específicos

Estudarem-se a turbidez do humor aquoso (flarimetria a “laser”) e a quantificação do TNF- α , da IL-1 β , da PGE₂ e da mieloperoxidase (MPO), em olhos de coelhos da raça Nova Zelândia Branco com uveíte induzida pela injeção intravítrea de LPS, tratados com morfina 1%.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal, em reunião ordinária de cinco de janeiro de 2011, sob o protocolo 014274/11. Cuidados bioéticos, relativamente às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985)*, foram obedecidos, consoante com o código de NÜREMBERG (GOLDIM, 1995).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 30 animais da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus* – LILLGEBORG, 1974), da raça Nova Zelândia Branco, adultos, com peso médio de 3,0kg, sendo 18 machos. No curso da investigação, 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*”.

Realizou-se o teste da lágrima de Schirmer¹, a biomicroscopia com luz em fenda², a tonometria de aplanção³, a oftalmoscopia binocular indireta⁴ e a prova de tingimento pela fluoresceína⁵. Utilizaram-se apenas indivíduos sem alterações oculares e em aparente estado de higidez sistêmica.

4.3 Procedimentos Anestésicos

Empregou-se anestesia dissociativa com cetamina⁶, na dose de 50mg/kg, em associação com xilazina⁷, na dose de 10mg/kg, pela via intramuscular e a instilação local de colírio anestésico⁸, para realizar a injeção intravítrea.

4.4 Uveíte experimental

Injetou-se, na câmara vítrea do olho direito, pela via “pars plana”, a aproximadamente 3,5 mm do limbo esclerocorneal, 0,1mL de uma solução contendo

¹ Teste de Schirmer®, Ophthalmos – São Paulo – SP

² Portable SL 14®, Kowa – Japan

³ Tonopen XL®, Mentor O&O – Norwell

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

⁵ Fluoresceína Strips®, Ophthalmos – São Paulo – SP

⁶ Ketamina Agener 10% (Agener União, São Paulo-SP)

⁷ Dopaser (Hertape Calier- Juatuba - MG)

⁸ Anestésico® (Allercan, Guarulhos- SP)

0,2 µg de endotoxina (parede celular de *Salmonella typhimurium*)⁹. Empregaram-se agulha (0,25X0,7mm) e seringa de 1ml (baseado em YANG et al.,1996).

4.5 Flaremetria a “laser”

A quantificação da turbidez do humor aquoso foi realizada empregando-se a flaremetria a “laser”¹⁰, estando os animais sob anestesia dissociativa (vide item 4.3). Posicionou-se a pupila no feixe de luz relativo à janela principal do equipamento. O feixe de “laser” incidido acima e abaixo da janela de mensuração resultou no sinal de “flare”, fornecido pelo equipamento em dispersão de fótons. Em cada indivíduo e em cada período avaliado, três repetições foram realizadas para obtenção da média quanto aos valores de fótons contabilizados. As avaliações ocorreram antes da indução da uveíte (basal) e decorridas 10 e 20 horas do insulto inflamatório.

4.6 Grupos Experimentais e Protocolos Terapêuticos

Quatro grupos (n=6) foram concebidos, grupo controle (GC), grupo morfina (GM), naloxona (GN), morfina-naloxona (GMN). Olhos com uveíte induzida receberam uma gota de solução salina 0,9% (GC), ou de morfina 1% (GM), ou de naloxona 1% (GN), ou de morfina e naloxona (GMN), imediatamente à indução da inflamação, e a intervalos regulares de duas horas, totalizando dez aplicações. Soluções oftálmicas de sulfato de morfina¹¹ a 1% e de naloxona¹² 1% sem conservante foram manipuladas industrialmente por fabricante autorizado. O pH foi ajustado em 6,0, pela adição de ácido clorídrico, para se evitar a precipitação do sal, e de hidróxido de sódio.

Avaliaram-se qualiquantitativamente os sinais clínicos inespecíficos da uveíte, tais como, o blefaroespasm, a hiperemia conjuntival, a secreção e a quemose (0= ausente, 1= leve, 2= moderada, 3= severa)(TOWNSEND, 2008).

Decorridas 20 horas, os coelhos foram novamente anestesiados (vide item 4.3), para posterior enucleação subconjuntival do olho direito de cada indivíduo e

⁹ L 6511 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)

¹⁰ Kowa FC-600®, Kowa, Japão

¹¹ Solução oftálmica experimental de morfina a 1% sem preservativo, Cristália, Campinas, SP.

¹² Solução oftálmica experimental de naloxona a 1% sem preservativo, Cristália, Campinas, SP.

realização da eutanásia ativa. Ato contínuo, a íris e o corpo ciliar foram colhidos (fig. 1), acondicionados em tubos de criogenia e preservados à -80°C , para a quantificação do $\text{TNF-}\alpha$, de $\text{IL-1}\beta$, da PGE_2 e do MPO, por imunoenensaio enzimático (ELISA).

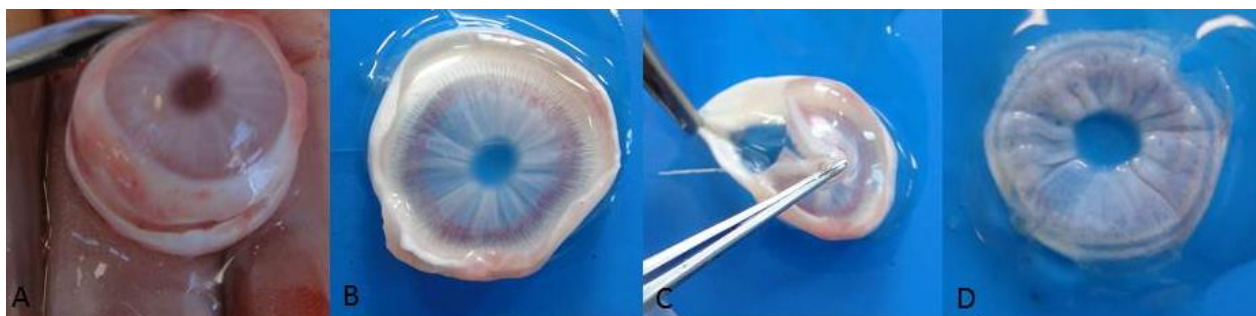


Figura 1. Imagem fotográfica ilustrando a sequência de eventos após a enucleação do olho direito de coelhos da raça Nova Zelândia Branco. Em A, secção da esclera para retirada do botão córneoesclearal; em B, botão córneoesclearal; em C, separação da íris e do corpo ciliar por tração; em D íris e corpo ciliar em condições de acondicionamento. Jaboticabal,SP, Brasil, 2013.

4.7 Imunoensaio enzimático (ELISA).

Visando - se à determinação da $\text{TNF-}\alpha$, da $\text{IL-1}\beta$, da PGE_2 e da MPO, as amostras colhidas foram submetidas à imunoensaio ligado a enzima. Para tal, elas foram descongeladas à temperatura ambiente e pesadas, padronizando-se o quantitativo de $100\ \mu\text{g}$ ($\pm 2\ \mu\text{g}$). Elas foram suspensas em um ml de solução tampão Fosfato Salino (PBS) com inibidor de protease, maceradas, homogeneizadas e centrifugadas a 900 rpm por dez minutos. Ato contínuo, foram processadas seguindo-se as recomendações dos fabricantes.

4.7.1 Fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$)¹³

Adicionaram-se $100\ \mu\text{L}$ da amostra em poços (em duplicata) e incubaram-se as placas durante duas horas à temperatura de $37\ ^{\circ}\text{C}$. Em seguida, adicionaram - se $100\ \mu\text{L}$ do reagente de detecção A, incubando-se a placa a 37°C por uma hora. Posteriormente, as placas foram lavadas por três vezes e secas. Posteriormente, $100\ \mu\text{L}$ do reagente de detecção B foram adicionados e procedeu-se à incubação por

¹³ Enzyme-linked Immunosorbent Assay kit, For Rabbit Tumor Necrosis Factor Alpha ($\text{TNF}\alpha$), Usn Life Science Inc, China

30 minutos a uma temperatura de 37 °C. Outras cinco lavagens foram realizadas. Após secas, 90µL da solução substrato foram adicionados, incubando-se por, aproximadamente, 15 a 25 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida, adicionando-se 50 µL de solução específica. Realizou-se a leitura em aparelho específico com filtro de 405 nanômetros; os dados da quantificação foram apresentados em picogramas por mililitros (pg/ml).

4.7.2 Interleucina 1-Beta (IL-1β)¹⁴

Utilizou-se o mesmo protocolo descrito para o TNF-α (item 4.7.1).

4.7.3 Prostaglandina E₂¹⁵

As amostras foram previamente preparadas, misturando 500 µl de cada amostra com 150 µl da solução carbonato “buffer”, incubando-se à temperatura de 37° C “overnight”. Em seguida, foram adicionados à mistura 200 µl de fosfato “buffer” e 150 µl de EIA “buffer”. A solução final foi utilizada para a realização dos ensaios e a placa foi montada de acordo com as indicações oferecidas pelo fabricante. Foram adicionados 50 µl de EIA “buffer” e 50 µl de PGEM “buffer” nos poços “Non- specific Binding” (NSB), e 50 µl de PGEM “buffer” no “Maximum Binding” (B₀) e a curva padrão foi montada na placa. Foram adicionadas 50 µl de amostra em cada poço (em duplicata). Ademais, foram acrescentados 50 µl de AchE “tracer” em todos os poços, exceto no poço atividade total (TA) e no poço “blank” (Blk). Em seguida, foram adicionados 50 µl PGEM EIA Antiserum em todos os poços, exceto nos poços atividade total (TA), “Non- specific Binding” (NSB) e “blank” (Blk). Finalizada a montagem, as placas foram incubadas por 18 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas cinco lavagens e, após secas, 200 µl de solução reagente Ellman`s foram adicionadas em cada poço, e cinco µl do tracer no poço de atividade total. Aguardaram-se 90 minutos e realizou-se a leitura com filtro de 405 e 420 nanômetros. Os dados da quantificação foram apresentados em picogramas por mililitros (pg/ml).

¹⁴ Enzyme-linked Immunosorbent Assay kit, For Rabbit Interleukin 1 beta (IL-1β), Uscn Life Science Inc, China

¹⁵ Prostaglandin E₂ ACh tracer, EIA KIT (monoclonal)[®], Cayman chemical – Ann Arbor, MI, EUA.

4.7.4 Mieloperoxidase (MPO) ¹⁶

Alíquotas da amostra foram diluídas na proporção de 1:40 em água de Milli Q e centrifugadas por dez minutos em rotação de 13,000rpm. Adicionaram-se 100 µl da amostra, 100 µl de “tracer”, 100 µl de estreptiva-peroxidase e 100 µl de substrato de TMP em cada poço contido nas placas (total de 12 poços por fileira em duplicata). Uma vez preenchidas, as placas foram cobertas com filme plástico e incubada por uma hora em temperatura ambiente. O período de incubação do substrato de TMP foi de 20 a 30 minutos.

Decorrida a incubação e esvaziado o conteúdo das placas, elas foram lavadas com solução de detergente tamponado e secas em temperatura ambiente. Duzentos µl de solução tampão de lavagem foram adicionados a cada poço e a lavagem foi repetida quatro vezes a cada troca de substância. Após a última etapa, utilizaram-se 100 µl de uma solução “stop¹⁷” para interromper a reação. Realizou-se a leitura, decorridos 30 minutos, utilizando leitor de placas com filtro de 412 nm. Os dados da quantificação foram apresentados pela medida da atividade enzimática em unidades internacionais (U) representada por mU /ml.

4.8 Estatística

Análise de variância não paramétrica de Friedman, seguida do “post hoc test” de Dunn foram utilizados para se avaliarem os dados relativos ao “flare” do humor aquoso, os quais foram expressos em medianas, máximos e mínimos. Os dados referentes à dosagem das citocinas foram tratados estatisticamente realizando – se Análise de Variância de via única, seguida pelo Teste Tukey. Os valores pertencentes à quantificação das citocinas foram expressos em média e erro padrão da média. Em ambos os testes no nível de significância de $p < 0,05$ ¹⁸ foi o adotado.

¹⁶ Myeloperoxidase (MPO) Activity Colorimetric Assay Kit , BioVision Research , Mountain View, EUA

¹⁷ Stop Mix (lyophilized) – Biovision- Myeloperoxidases (MPO) Activity colorimetric assay kit.

¹⁸ SigmaStart 3.0®, Systat Software inc, San Jose, EUA.

5. RESULTADOS

Em todos os grupos tratados, observou-se blefaroespasm,(Tab. 1), hiperemia conjuntival (Tab. 2), secreção (Tab. 3), quemose (Tab. 4) e “rubeosis irides”, avaliados decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte.

Tabela 1. Blefaroespasm, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.

Grupo/grau	10 horas			20horas		
	leve	moderado	severo	leve	Moderado	Severo
GP		3	3	2	1	3
GM		2	4	2	3	1
GN		2	4	2	2	2
GMN		3	3	1	3	2

Tabela 2. Hiperemia conjuntival, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.

Grupo/grau	10 horas			20 horas		
	leve	moderado	severo	leve	moderado	Severo
GP	2	3	1	0	4	2
GM	2	2	2	1	3	2
GN	3	2	1	1	3	2
GMN	2	2	2	0	3	3

Tabela 3. Secreção, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.

Grupo/grau	10 horas			20 horas		
	leve	moderado	severo	leve	moderado	severo
GP	2	1	0	1	2	0
GM	1	2	1	1	1	2
GN	1	3	0	2	1	0
GMN	0	1	1	0	1	2

Tabela 4. Quemose, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.

Grupo/grau	10 horas			20 horas		
	leve	moderado	severo	leve	moderado	severo
GP	2	2	0	3	0	0
GM	2	1	0	1	1	1
GN	3	0	0	3	0	0
GMN	4	1	1	2	0	1

5.1 Flaremetria a “laser”

Os resultados relativos à contagem de fótons no humor aquoso encontram-se expressos em medianas e em valores máximo e mínimo.

Observou-se elevação não significativa ($p>0,05$) desde o período basal até a vigésima hora de avaliação em GM, GN e em GMN (Fig. 2 e Tab. 1). Em GP, a contagem de fótons foi maior no período basal, comparativamente aos demais períodos, entretanto, sem diferença significativa ($p>0,05$). Decorridas 20 horas da

indução da uveíte, a contagem de fótons apresentou-se mais elevada em GM, seguida por GMN, GN e GP, todavia, sem diferença estatística significativa ($p>0,05$).

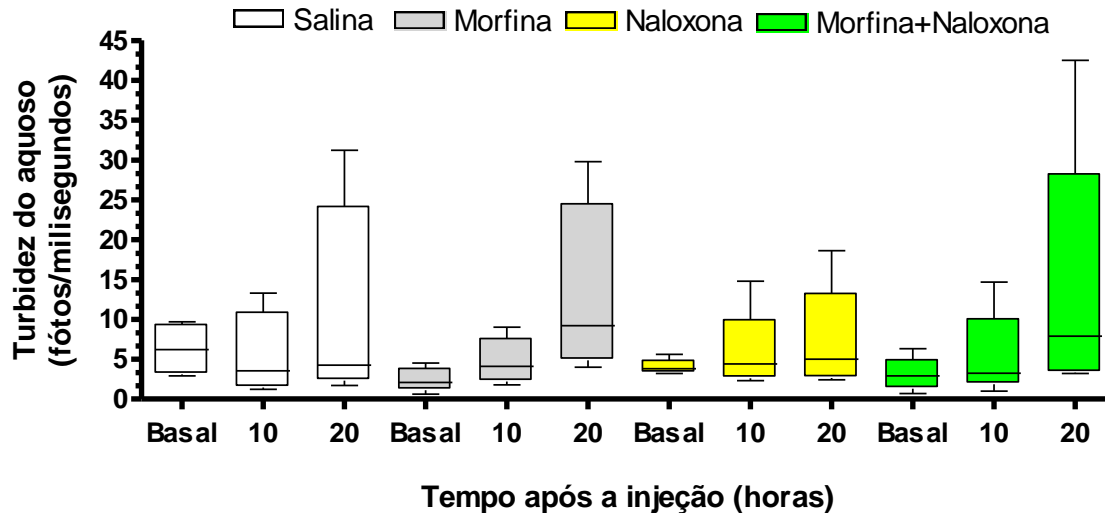


Figura 2. Medianas, máximo, mínimo e quartis (25 e 75%)* relativos à quantificação da turbidez do humor aquoso (fótons/milissegundos), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, antes (basal) e decorridas 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.

*Teste de Dunn ($p>0,05$).

Tabela 5. Medianas, máximo e mínimo* relativas à quantificação da turbidez do humor aquoso (fótons/milissegundos), em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, antes (basal) e decorridos 10 e 20 horas da indução da uveíte, nos grupos tratados com solução salina 0,9%(GP), morfina (GM), naloxona (GN) e morfina mais naloxona (GMN). Jaboticabal, SP, Brasil, 2013.

Grupos	Basal	10 horas	20 horas
Salina	6,20 (2,90-9,70)	3,55 (1,20-13,30)	4,25 (1,70-31,20)
Morfina	2,10 (0,60-4,50)	4,10 (1,80-9,00)	9,20 (4,00-29,80)
Naloxona	3,80 (3,20-5,60)	4,40 (2,30-14,80)	5,00 (2,40-18,60)
Naloxona+Morfina	2,90 (0,70-6,30)	3,25 (1,00-14,70)	7,90 (3,20-42,50)

*Teste de Dunn ($p>0,05$)

5.2 Imunoensaio enzimático (ELISA).

Os resultados relativos à quantificação das citocinas encontram-se expressos na forma de média e erro padrão da média (EPM).

Na quantificação de citocinas, verificou-se que, após a injeção do lipopolissacarídeos, houve elevação significativa nos níveis de IL1-beta e TNF-alfa, comparativamente ao basal ($p < 0,05$), em todos os grupos estudados (GP, GM, GN, GMN) (Figs. 3,4 e 6). Os níveis foram similares entre os grupos e não houve diferença significativa ($p > 0,05$), exceto em relação à PGE_2 , que apresentou níveis inferiores aos demais no grupo NM ($p < 0,05$) (Fig.5).

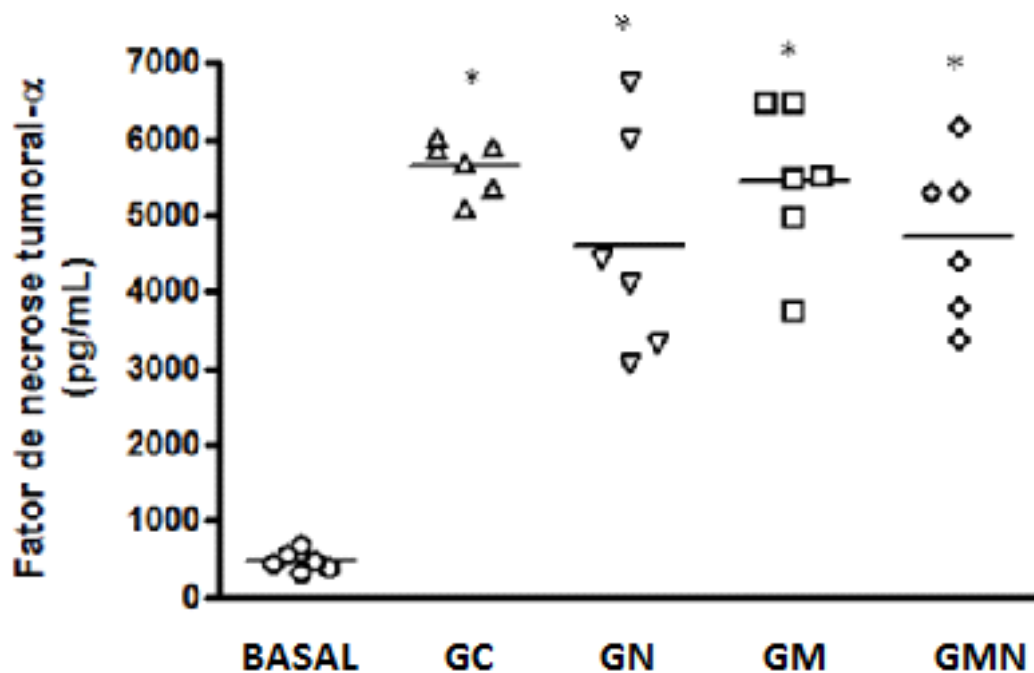


Figura 3. Níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) previamente à injeção de lipopolissacarídeos (Basal), e após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com solução salina (GC), ou com naloxona (GN), ou com morfina (GM) e ou com morfina e naloxona (MN), onde o traço é a média, e os pontos a dispersão individual, abaixo e acima da média de cada indivíduo, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Uberlândia, MG, Brasil, 2013.

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

Encontrou-se diferença significativa ($p < 0,001$) na quantificação do Fator de Necrose Tumoral alfa entre o nível basal $467,1 \pm 54,54$ pg/ml e os grupos tratados: GC $5652 \pm 145,7$ pg/ml, GN $4601 \pm 599,7$ pg/ml, GM $5442 \pm 417,7$ pg/ml, GMN $4714 \pm 426,9$ pg/ml.

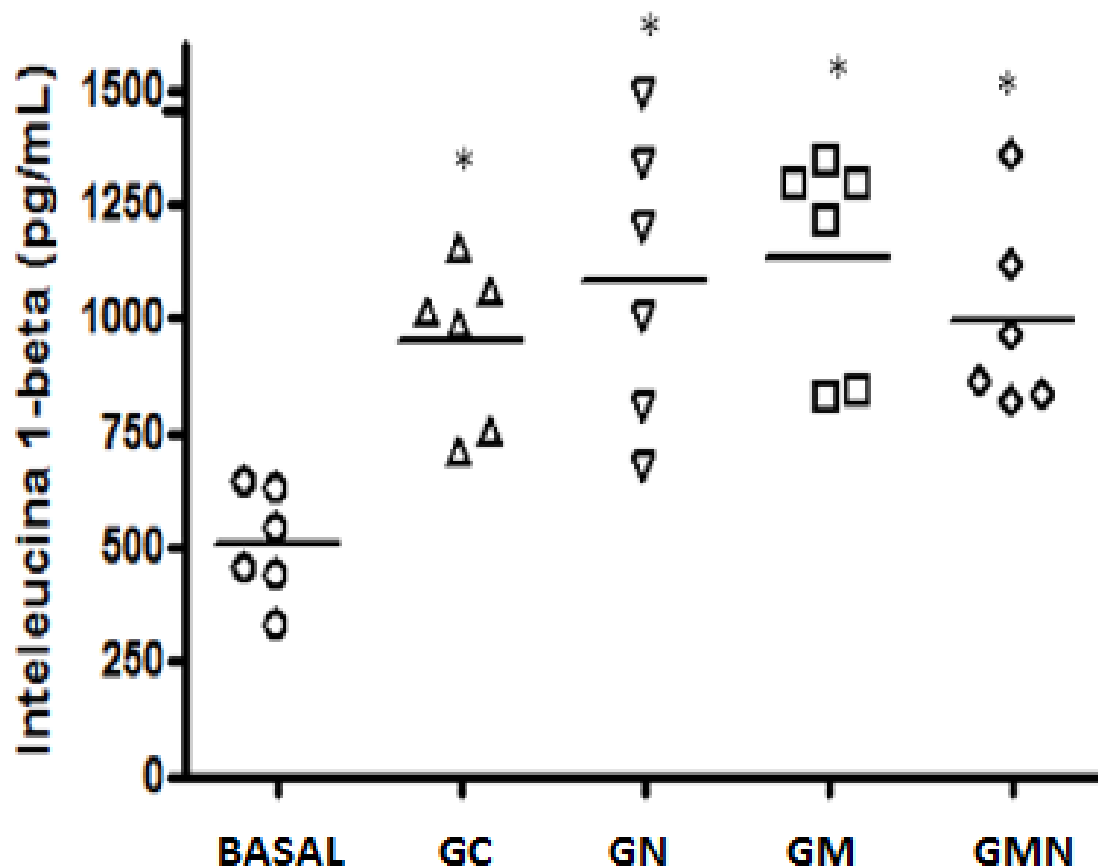


Figura 4. Níveis de interleucina 1-beta ($IL-1\beta$), previamente à injeção de lipopolissacarídeos (Basal) e, após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com solução salina (GC) ou com naloxona (GN), ou com morfina (GM) e/ou com morfina e naloxona (MN), onde o traço é a média e os pontos a dispersão individual, abaixo e acima da média de cada indivíduo, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Uberlândia, MG, Brasil, 2013.

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

Relativamente ao período basal, observou-se elevação significativa ($p < 0,001$) na quantificação de interleucina 1- beta nos grupos tratados GC $950,1 \pm 71,97$ pg/ml, GN $1087 \pm 127,9$ pg/ml, GM $1137 \pm 96,53$ pg/ml, GMN $994,2 \pm 86,03$ pg/ml comparativamente ao basal que foi de $509,3 \pm 49,59$ pg/ml.

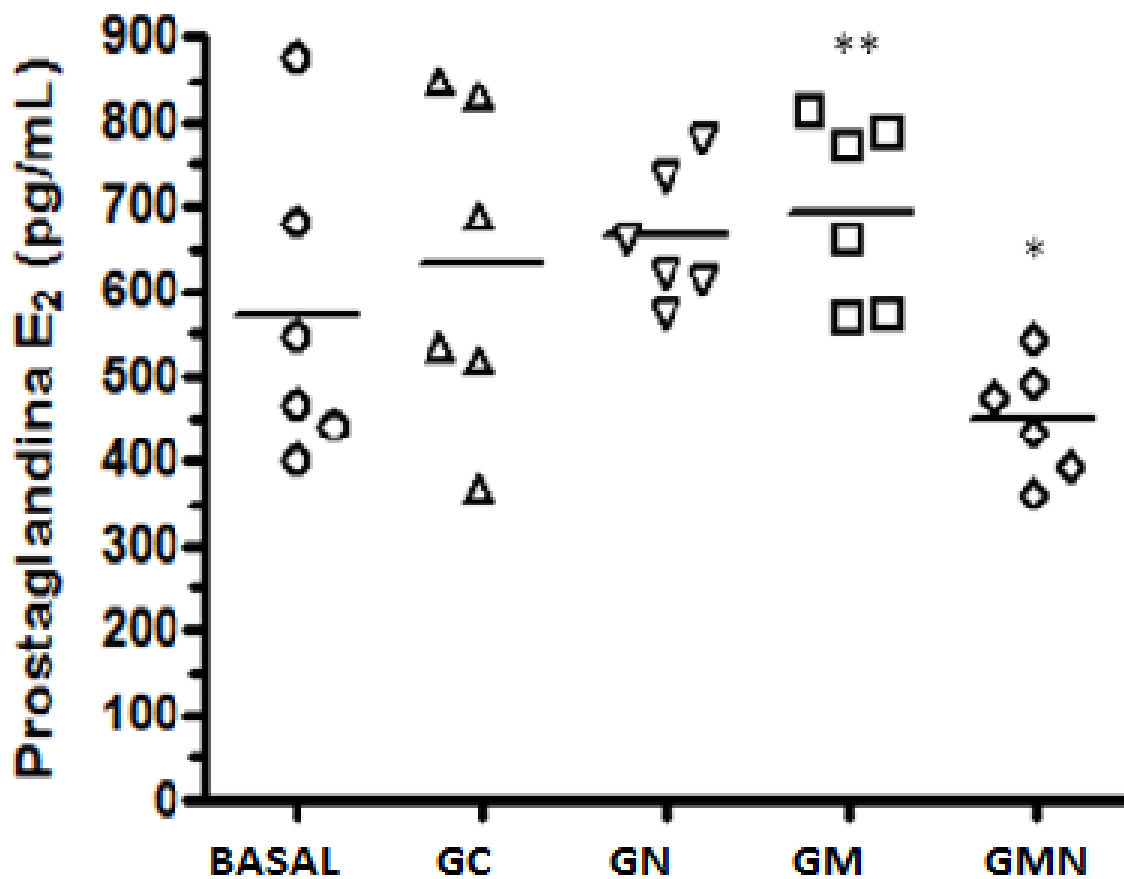


Figura 5. Níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) previamente à injeção de lipopolissacarídeos (Basal) e, após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com solução salina (GC) ou com naloxona (GN), ou com morfina (GM) e/ou com morfina e naloxona (MN), onde o traço é a média, e os pontos a dispersão individual, abaixo e acima da média de cada indivíduo, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Uberlândia, MG, Brasil, 2013.

* e ** diferem significativamente ao Teste Tukey ($p < 0,05$)

Na avaliação, quanto aos valores de Prostaglandina E₂, não houve diferença significativa ($p < 0,001$), comparando a quantificação no momento basal $569,7 \pm 73,99$ pg/ml e os grupos de tratamento GC $632,1 \pm 77,44$ pg/ml, GN $663,7 \pm 32,67$ pg/ml, GM $694,2 \pm 45,12$ pg/ml, GMN $449,4 \pm 27,29$ pg/ml. Encontrou-se variação significativa ($p < 0,001$) entre os grupos GM $694,2 \pm 45,12$ pg/ml, GMN $449,4 \pm 27,29$ pg/ml.

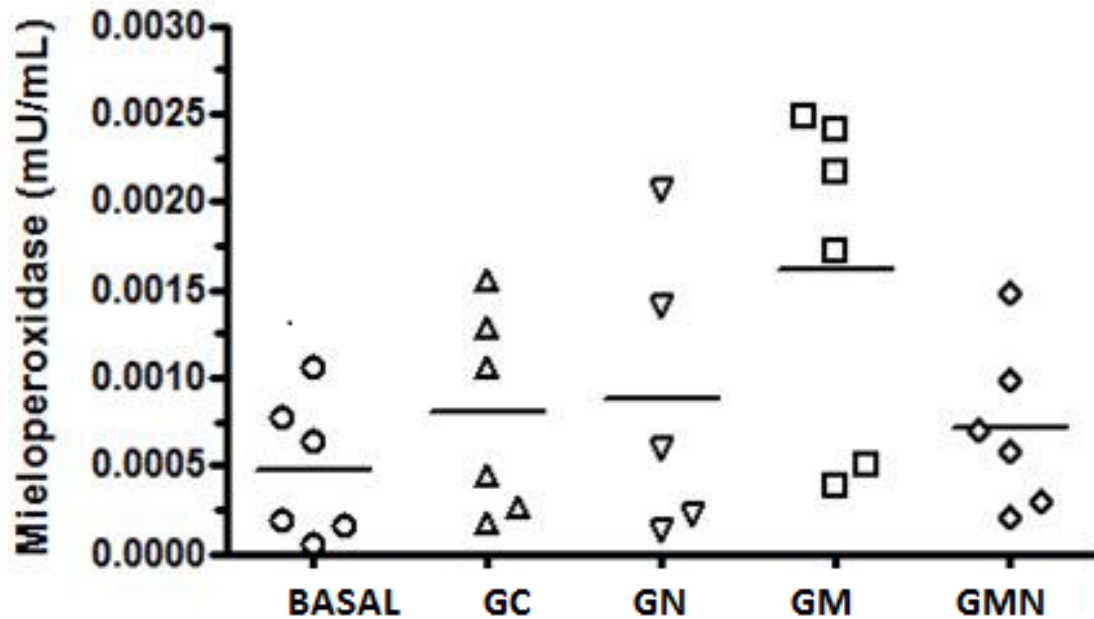


Figura 6. Níveis mieloperoxidase (MPO), previamente à injeção de lipopolissacarídeos (Basal) e, após a injeção de lipopolissacarídeo, em olhos tratados com solução salina (GC) ou com naloxona (GN), ou com morfina (GM) e/ou com morfina e naloxona (MN), onde o traço é a média e os pontos a dispersão individual, abaixo e acima da média de cada indivíduo, em coelhos da raça Nova Zelândia Branco, Uberlândia, MG, Brasil, 2013.

* Análise de Variância ($p=0,07$)

Na avaliação do nível de mieloperoxidase, não se encontrou variação significativa ($p<0,001$) estatisticamente quanto à quantificação basal $0,0004780 \pm 0,0001647$ mU/ml, e os grupos tratados GC $0,0007975 \pm 0,0002362$ mU/ml, GN $0,0008826 \pm 0,0003697$ um/ml, GM $0,01615 \pm 0,0003838$ mU/ml, GMN $0,0007086 \pm 0,0001935$ mU/ml.

6. DISCUSSÃO

A uveíte cursa com muitas das doenças intraoculares, por ser a úvea vascularizada e contígua a outras estruturas do olho (COLLIS E MOORE, 1999; KOSAK e VERWAERDE, 2002; TOWNSEND, 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

A injeção de LPS constitui método eficaz para indução da uveíte, podendo ser realizada pelas vias intraperitoneal, subcutânea, intracameral e intravítrea (YANG et al., 1996, DEL SOLE et al. 2008, ISHIDA et. al.,2010, KANAI et.al 2010, WANG et al.,2010, XU et al., 2010). No presente estudo, a intravítrea foi utilizada mostrando-se útil ao permitir lograr os objetivos buscados (BITO 1974; DEL SOLE et al. 2008).

Sinais clínicos da uveíte, tais como blefarospasmo, hiperemia conjuntival, secreção e quemose, iniciaram-se decorridas duas horas da injeção e persistiram até a vigésima, sem que houvesse quaisquer alterações suscitadas pelos tratamentos, corroborando com estudo realizado previamente (BITO, 1974).

No curso da uveíte, mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas e leucotrienos, atuam como substâncias vasoativas, ensejando hiperemia conjuntival, injeção de vasos episclerais e ingurgitamento dos vasos da íris. (TEIXEIRA et al., 2009). Green et al. (1990) demonstraram, à angiografia fluoresceínica, aumento no fluxo sanguíneo da íris, do corpo ciliar e da coróide, entre 3 e 24 horas da injeção intravítrea da endotoxina. No presente estudo, observou-se “rubeosis iridis” nos olhos submetidos à injeção intravítrea de LPS. Nussenblatt et al.(2012) encontraram o evento em menos de 1% de olhos de coelhos com uveíte experimental, por LPS intracameral, não obstante terem utilizado animais da raça Dutch-Belte, em que o trato uveal é pigmentado (NUSSENBLATT et al. 2012). No mesmo estudo, os autores observaram por flaremetria a “laser”, aumento do “flare” decorridas 3 horas da injeção de LPS, e a sua redução, decorridas 9 horas. No presente estudo, a injeção intravítrea de endotoxina não produziu alterações interpretáveis à flaremetria até a vigésima hora da indução. Embora não quantificado, observou-se “flare”, por meio de exame clínico com lâmpada em fenda, em todos os indivíduos a partir da segunda aplicação dos tratamentos. A ausência de pigmentação no trato uveal pode influenciar negativamente resultados da fotoflaremetria (NUSSENBLATT et al. 2012). Oportuno seria investigar a eficácia do método, comparativamente à

quantificação de mediadores inflamatórios, no humor aquoso (RIBEIRO et al. 2009; TEIXEIRA et al. 2009, GILMOUR E PAYTON, 2012; KOBASHIGAWA et al. 2012).

Interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-6, interferon- γ , TNF- α foram detectados em olhos inflamados com uveíte idiopática (OOI et al. 2006). O TNF- α é produzido por células inflamatórias e do sistema imune e atua como importante mediador inflamatório na iniciação e na continuidade da inflamação (OOI et al. 2006). Em estudos realizados em ratos e em seres humanos, observaram-se aumento da expressão de TNF- α no infiltrado de células inflamatórias (OKADA et al. 1998; ATAN et al. 2013). Resultados do presente estudo decorreram à similitude de outros, quanto à utilização de LPS na indução da inflamação (PEREIRA et al. 2012; LIANG et al. 2013), havendo incremento de IL-1 β e de TNF- α . Diferindo de resultados obtidos por Pinard et al. (2011), que não constatou incremento significativo de TNF- α após indução de uveíte por paracentese em cães. Não se observou aumento significativo na atividade da MPO após a indução da uveíte, diferentemente do que fora observado por Pereira (2012), após a indução de uveíte por injeção subcutânea de LPS.

Valores de PGE₂, na íris e no corpo ciliar, no momento basal, apresentaram-se elevados, ocorreu apenas um leve incremento após a injeção de LPS. Quando comparado o valor basal com os demais grupos, não se observou diferença significativa, possivelmente em decorrência de em olhos inflamados a PGE₂ ser liberada para o humor aquoso. Amostras de humor aquoso de indivíduos sem uveíte exibiram valores pouco detectáveis de PGE₂, já em indivíduos com uveíte instalada os valores de PGE₂ apresentam-se elevados (CRUZ et al. 2007; MEDEIROS et al. 2008; RIBEIRO et al. 2009). No grupo tratado com morfina e naloxona, observou-se uma redução significativa dos níveis dessa citocina, demonstrando que a naloxona bloqueou um possível efeito inflamatório da morfina que foi observado no estudo realizado por Kobashigawa et al. (2012).

No presente estudo, o uso local da morfina não ensejou efeito anti-inflamatório no tecido uveal. Em pesquisas conduzidas por Wenk et al. (2003), por Clark et al. (2007) e por Husain et al (2011), foram utilizadas outras vias de administração da substância e outros tecidos foram analisados com diminuição da expressão de citocinas após injúria na córnea, na pele e na retina.

Estudando os efeitos de antagonista opióide (naloxona,) Greenelch et al. (2004), identificaram inibição da produção de TNF- α em ratos com choque séptico induzido por LPS. No presente estudo, essa inibição da produção dessa citocina não foi observada no tecido uveal.

A administração local da morfina, no presente estudo, não foi capaz de reduzir valores de PGE₂. Pesquisa realizada por van LOON et al. (2010) possibilitou que se observasse redução nos níveis de PGE₂ após a injeção intra-articular de morfina, em sinovites experimentais. Não foram encontrados estudos que mostrassem efeitos anti-inflamatórios da instilação da morfina sobre o trato uveal, é provável que a via de administração possa não ter possibilitado que a substância alcançasse os tecidos estudados, talvez se fosse administrado por via intra-vítrea ou intra-cameral, a morfina em contato direto com o trato uveal poderia apresentar uma resposta diferente da encontrada no presente estudo. No grupo (morfina-naloxona), observou-se decréscimo dos níveis de PGE₂, possivelmente pelo fato da morfina ter apresentado uma pequena elevação na quantidade de PGE₂ e, ao utilizar em conjunto com a naloxona, ocorreu a inibição dos possíveis efeitos inflamatórios da morfina. O mesmo não fora observado em relação às demais citocinas estudadas, tampouco quanto aos efeitos anti-inflamatórios de fármacos utilizados isoladamente. Encontrou-se na literatura nenhum relato de sinergismo, conquanto os fármacos utilizados sejam antagonistas competitivos. Novas pesquisas contribuíram para a melhor compreensão dos efeitos, possibilitando o uso dessa substância como adjunta na terapêutica de uveítes .

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, considerando a maneira como a pesquisa fora concebida e as injunções do meio onde ela fora realizada, é possível admitir que a morfina não mostrou efeito anti-inflamatório sobre a expressão de citocinas e dos mediadores inflamatórios estudados, quando utilizada localmente, por instilação, em olhos de leporinos da raça Nova Zelândia Branco com uveíte induzida por injeção intravítrea de endotoxinas.

9. REFERÊNCIAS

- ATAN D., HEISSIGEROVA J., KUFFOVÁ L., HOGAN A., KILMARTIN D.J. FORRESTER J. V., BIDWELL J.L., DICK A.D., CHURCHILL A.J. Tumor necrosis factor polymorphisms associated with tumor necrosis factor production influence the risk of idiopathic intermediate uveitis. **Molecular Vision**. V.19, p. 184-195, 2013.
- BITO L. Z. The effects of experimental uveitis on anterior uveal prostaglandin transport and aqueous humor composition. **Investigative Ophthalmology**. V.13, n.12, p.959-966, 1974
- BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; MAIA; F.C.L.; SANTOS, E.S.C.; LAUS, J.L.; MEUNIER, I.M.J. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.5, p.768-775, 2006.
- CARTER, W.J.; CRISPIN, S.M.; GOULD, D.J.; DAY, M. An immunohistochemical study of uveodermatologic syndrome in two Japanese Akita dogs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.8, n.1, p.17-24, 2005.
- CHOI, Y.; CHUANG, L.F.; LAM, K.M.; KUNG, H.F.; WANG, J.M.; OSBURN, B.I.; CHUANG, R.Y. Inhibition of chemokine-induced chemotaxis of monkey leukocytes by m-opioid receptor agonists. **In Vivo**. v.13, n.5, p.389–396, 1999.
- COLLINS, B.K.; MOORE, C.P. Diseases and surgery of the canine uvea. *In* **GELATT, K.N. Veterinary Ophthalmology** 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, p.755-795, 1999.
- CLARK, J.D.; SHI, X.; LI, X.; QIAO, Y.; LIANG, D.; ANGST, M.S.; YEOMANS, D.C. Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. **Molecular Pain**. v.2, n.3, p.28-39, 2007.
- de KOZAK, Y.; VERWAERDE, C. Cytokines in immunotherapy of experimental uveitis. **International Reviews Immunology**, v.21, n.2-3, p.231-253, 2002.
- DENIS, H.M.; BROOKS, D.E.; ALLEMANARA.R.; ANDREW, S.E.; PLUMMER, C. Detection of anti-lens crystallin anti-body in dogs with and without cataract. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.6, n.4, p.321-327, 2003.
- DEL SOLE M. J.; . SANDE P.H.; FELIPE A. E. ; FERNANDEZ D. C.; SARMIENTO M. I. K.; ABA M. A.; ROSENSTEIN R. E. Characterization of uveitis induced by use of a single intravitreal injection of bacterial lipopolysaccharide in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.69, n.11, p.1487-1495, 2008.
- DIZIEZYC, J.; MILLICHAMP, N.J.; KELLER, C.; SMITH, W. Effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and leucotriene D_4 on pupil size, intraocular pressure, and blood-aqueous barrier in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.53, n.8, p.1302-1304, 1992.

DORTCH-CANES, J.; RUSSEL, K. Morphine-stimulated nitric oxide release in rabbit aqueous humor. **Experimental Eye Research**, v.84, n.1, p.185-190, 2007.

DORTCH-CANES, J.; RUSSEL, K. Morphine-induced nitric oxide production in isolated, iris-ciliary bodies. **Experimental Eye Research**, v.89, n.5, p.660–664, 2009.

EL-SHABRAWI, Y.G.; CHRISTEN, W.G.; FOSTER, S.C. Correlation of metalloproteinase-2 and -9 with proinflammatory cytokines interleukin-1b, interleukin-12 and the interleukin-1 receptor antagonist in patients with chronic uveitis. **Current Eye Research**, v.20, n.3, p.211-214, 2000.

GELATT, K.N.; GELATT, J.P. Surgical procedures of the anterior chamber and anterior uvea. In: **Small Animal Ophthalmic Surgery**. Oxford: Butterworth e Heinemann, p.219-243, 2001.

GILMOUR, M.A.; PAYTON, M.E. Comparison of the effects of IV administration of meloxicam, carprofen, and flunixin meglumine on prostaglandin E(2) concentration in aqueous humor of dogs with aqueocentesis-induced anterioruveitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.73, n.5, p.698-703, 2012.

GODOY, C.A.L.; SAFATLE, A.M.V.; SOUZA, M.S.B.; BARROS, P.S.M. Síndrome uveodermatológica – relato de caso em chow-chow. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.52, p.78-84, 2004.

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

GONÇALVES, R. M.; TEIXEIRA, A. L.; CAMPOS, W. R.; ORÉFICE, F. O papel das quimiocinas nas uveítes. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.70, n.2, p.363-370, 2007.

GOZZANI J.L. Opióides e Antagonistas. **Revista brasileira de Anestesiologia**. v. 44, n. 1. P. 65 – 73. 1994.

GREEN, K.; PATERSON, C.A.; CHEEKS, L.; SLAGLE, T.; JAY, W.M.; AZIZ, M.Z.; Ocular blood flow and vascular permeability in endotoxin-induced inflammation. **Ophthalmic Research**. n.22, v.5, p.287–294, 1990.

GREENELTCH, K. M.; HAUDENSCHILD, C. C.; KEEGAN, A. D.; SHI, Y. The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor- α production. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.18, n.5, p.476-480, 2004.

GUM, G.G.; GELATT, K.N.; OFRI, R. Physiology of the eye. In: **GELATT, K.N. Veterinary Ophthalmology**. 3.ed, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, p.151-182, 1999.

HONSHO, C. S.; ORIÁ; A.P.; LAUS, J.L. Uveíte induzida pelo cristalino em cães - prevalência em estudo retrospectivo. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.39, p.16-20, 2002.

HONSHO, C. S.; MINE, S.Y.; ORIÁ; A.P.; BENATO, N.; CAMACHO, A.A.; ALESSI, A.C., LAUS, J.L. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.2, p 155-159, 2003.

HUSAIN, S.; LIOU, G. I.; CROSSON, C. E. Opioid Receptor Activation: Suppression of Ischemia/Reperfusion-Induced Production of TNF- α in the Retina. **Investigative Ophthalmology e Visual Science**, v.52, n.5,p.2577-2583 , 2011.

HUSAIN, S.; ABDUL, Y.; CROSSON, C. E. Preservation of Retina Ganglion Cell Function by Morphine in a Chronic Ocular-Hypertensive Rat Model. **Investigative Ophthalmology Visual Science**. v.53, n.7, p.4289-4298, 2012.

ISHIDA, S.; KOTO, T.; NAGAI, N.; OIKE, Y. Calcium channel blocker nilvadipine, but not diltiazem, inhibits ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. **Japanese Journal Ophthalmology**, v.54, n.6, p.594-601, 2010.

KANAI, K.; ITOH, N.; ITO, Y.; NAGAI, N.; HORI,Y.; CHIKAZAWA, S.; HOSHI, F.; HIGUCHI, S. Anti-inflammatory Potency of Oral Disulfiram Compared with Dexamethasone on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.73, n.4, p.517-520, 2011.

KANAI, K.; ITOH, N.; YOSHIOKA, K.; YONEZAWA, T.; IKADAI, H.; HORI, Y.; ITO, Y.; NAGAI, N.; CHIKAZAWA, S.; HOSHI, F.; HIGUCHI, S. Inhibitory effects of oral disulfiram on endotoxin-induced uveitis in rats. **Current Eye Research**, v.35, n.10, p.892-899, 2010.

KOBASHIGAWA K.K, SOUZA E.S., PADUA I.R.M., ANDRADE A.L., RIBEIRO A.P., BARROS S.V.S.G., MARTINS B.C., LAUS J.L. Clinical Features, Cellularity of Corneal Endothelium, Laser Flaremetry and Aqueous Humor Total Protein Concentration in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with Uveitis Following Treatment with 1% Morphine Sulfate. **Veterinary Ophtalmology**, Oxford, v.1, n.12, p.7, abstract n 41, 2012.

KONSTANTOPOULOU, K.; DEL`OMO, R; MORLEY, A.M.; KARAGIANNIS, D.; BUNCE,C.; PAVESIO. C. A comparative study between clinical grading of anterior chambre flare and flare Reading using the Kowa laser flare meter. **Int Ophthalmol** publicado online 02 agosto de 2012.

KROHNE SG, GIONFRIDDO J, MORRISON EA. Inhibition of pilocarpine-induced aqueous humor flare, hypotony, and miosis by topical administration of anti-inflammatory and anesthetic drugs to dogs. **American Journal of Veterinary Research**.v.59, n.4,p.482-488, 1998.

LAUS, J.L.; SOUZA, M.G.; CABRAL, V.P.; MAMEDE, F.V.; TINUCCI C.M., Uveodermatologic syndrome in a Brazilian filar dog. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.7, n.3, p.193-196, 2004.

LEASURE, J; GELATT, K.N; MACKAY, E.O. The relationship of cataract maturity to intraocular pressure in dogs. **Veterinary Ophthalmology**. v.4, n.4, p.273-276, 2001.

LIANG, L., TAN, X.; ZHOU, Q.; ZHU, Y.; TIAN, Y.; YU, H.; KIJLSTRA, A.; YANG, P. IL-1b Triggered by Peptidoglycan and Lipopolysaccharide through TLR2/4 and ROS-NLRP3 Inflammasome-Dependent Pathways Is Involved in Ocular Behcet's Disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.54, n.1, p.402-414, 2013

LINDEGAARD, C.; GLEERUP, K.B.; THOMSEN, M.H.; MARTINUSSEN, T.; JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P.H. Anti-inflammatory effects of intra-articular administration of morphine in horses with experimentally induced synovitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.71, n.1, p.69-75, 2010.

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

MASSA, K.L.; GILGER, B.C.; MILLER, T.L.; DAVIDSON, M.G. Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). **Veterinary Ophthalmology**, v.5, n.2, p.93-98, 2002.

MEDEIROS R.; RODRIGUES G. B.; FIGUEIREDO C. P.; RODRIGUES E. B.; GRUMMAN JR. A.; MENEZES-DE-LIMA. JR. O.; PASSOS G. F.; CALIXTO J. B. Molecular Mechanisms of Topical Anti-Inflammatory Effects of Lipoxin A4 in Endotoxin-Induced Uveitis **Molecular Pharmacology**. V.74, n.1, p 154-161, 2008

MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Revista Brasileira de Circulação Cardiovascular**, v.16, n.4, p.376-387, 2001.

NUSSEBLATT. R.B.; CALOGERO D.; BUCHEN S.Y.; LEDER H. A.; GOODKIN M.; EYDELMAN M. B.; Rabbit intraocular reactivity to endotoxin measured by slit – lamp biomicroscopy and laser flare photometry. **American Academy of Ophthalmology**. v.119, n.7, p.19-23, 2012.

OKADA AA, SAKAI J, USUI M, MIZUGUCHI J. Intraocular cytokine quantification of experimental autoimmune uveoretinitis in **Ocular Immunology and Inflammation**, v.6,n.2 ,p.111-120,1998.

OOI, K. G. J.; GALATOWICZ, G.; CALDER, V. L.; LIGHTMAN, S. L. Cytokines and Chemokines in Uveitis – Is there a Correlation with Clinical Phenotype **Clinical Medicine e Research**, v. 4, n. 4, p. 294-309, 2006.

ORIÁ, A.P.; PEREIRA, P.M.; LAUS, J.L.; Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1289-1295, 2004.

Pereira D. V. ; Petronilho F; Pereira H. R.S.B; Vuolo F.; Mina F.; Possato J. C.; Vitto M.F.; Souza D.R.; Silva L.; Paula M. M. S.; Souza C. T.; Dal-Pizzol F. Effects of Gold Nanoparticles on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. . **Investigative Ophthalmology e Visual Science**. v.53, n.13, p.8036-8041, 2012.

PINARD, C.L; GAUVIN, D; MOREAU, M; PELLETIER, J.M; PELLETIER, J.P; TRONCY, E. Measurements of canine aqueous humor inflammatory mediators and the effect of carprofen following anterior chamber paracentesis. **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.3, p.1-8, 2011.

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

RANKIN AJ, KHRONE SG, STILES J. Evaluation of four drugs for inhibition of paracentesis-induced blood-aqueous humor barrierbreakdown in cats. **American Journal of Veterinary Research**.v.72, n.6, p.826-832, 2011.

RANKIN AJ, KROHNE SG, GLICKMAN NW, GLICKMAN LT, STILES J. Laser flaremetric evaluation of experimentally induced blood-aqueous barrier disruption in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.5, p.750-756, 2002.

RIAZI-ESFAHANI, M.; KIUMEHR, S.; ASADI-AMOLI, F.; DEHPOUR, A. R. Effects of Intravitreal Morphine Administered At Different Time Points After Reperfusion in A Rabbit Model of Ischemic Retinopathy. **The Journal of Retinal and Vitreous Diseases**, v. 29, n.2 , p. 262-268, 2009.

RIBEIRO, A.P.; ESCOBAR, A.; MOTHEO, T.F.; GODOY, G.S.; LAUS, J.L. Effects of meloxicam administered by different routes to control experimental uveitis in dogs. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2111-2116, 2009.

RIBEIRO, A.P.; SILVA, M.L.; ARAÚJO, R.L.; FERRUCCI, D.L.; MINEO, T.; THIESEN, R.; 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.

SAWA M, TSURIMAKI Y, TSURU T, SHIMIZU H. New quantitative method to determine protein concentration and cell number in aqueous in vivo. *Japanese Journal of Ophthalmology*, v34, p.346-63, 1990.

SLATTER, D., Úvea In: **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**, 3ª ed., ed. Roca, São Paulo, 2005. p.339 – 376

STAGNI, E.; BUCOLO, C.; MOTTERLINI, R.;DRAGO,F; Morfine-Induced Ocular hypotension Is Modulated by Nitric Oxide and Carbon Monoxide:Role of $\mu 3$

Receptors. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. v.26, n.1, p.31-35, 2010.

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. Peripheral opioid receptor mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.248, n.3, p.1269-1275, 1989.

STILES, J.; HONDA, C.N.; KROHNE, S.G. 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.

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

TOWNSEND, W. M. Canine and feline uveitis. **Veterinary Clinical Small Animals**. 38 (2008) 323-346.

TU, K.L.; KAYE, S.B.; SIDARAS, G.; TAYLOR, W.; SHENKIN, A. Effect of intraocular surgery and ketamine on aqueous and serum cytokines. **Molecular Vision**, v.12, n.13, p.1130-1137, 2007.

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

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.412-9, 2010.

WANG, X.Q.; LIU, H.L.; WANG, G.B.; WU, P.F.; YAN, T.; XIE, J.; TANG, Y.; SUN, L.K.; LI, C. Effect of Artesunate on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. . **Investigative Ophthalmology e Visual Science**. v.52, n.2, p.916-919, 2011.

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.3, p. 455–465, 2003.

XU, Y.; CHEN, W.; LU, H.; HU, X.; LI, S.; WANG, J.; ZHAO, L. The expression of cytokines in the aqueous humor and serum during endotoxin-induced uveitis in C3H/HeN mice. **Molecular Vision**, v.21, n.16, p.1689-1695, 2010.

YANG, P.; de VOS, A.F.; KIJLSTRA, A. Macrophages in the retina of normal Lewis rats and their dynamics after injection of lipopolysaccharide. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.37, n.1, p.77-85, 1996.