

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

**EFEITOS DE PREPARAÇÕES ANTIPROTEOLÍTICAS
NO TRATAMENTO DA CERATITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL EM RATOS (*Rattus norvegicus*
LINHAGEM WISTAR, VARIAÇÃO *albinus*, LINNAEUS,
1758)**

Dunia Yisela Trujillo Piso
Médica Veterinária Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2011

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

EFEITOS DE PREPARAÇÕES ANTIPROTEOLÍTICAS
NO TRATAMENTO DA CERATITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL EM RATOS (*Rattus norvegicus*
LINHAGEM WISTAR, VARIAÇÃO *albinus*, LINNAEUS,
1758)

Dunia Yisela Trujillo Piso

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Co-Orientadora: Dra. Adriana Morales

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

Jaboticabal – SP- Brasil
Abril de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Dunia Yisela Trujillo Piso - nascida em 13 de junho de 1983. Graduiu-se em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidad del Tolima, Colômbia em abril de 2005. Posteriormente atuou como Médica Veterinária autônoma até outubro de 2007. Foi estagiária do Setor de Oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, UNESP- Jaboticabal, de 2007 a 2008 . Em março de 2009 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal. Integrante do corpo clínico e cirúrgico do ambulatório de oftalmologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” de dezembro de 2008 à julho de 2011.

AGRADECIMENTOS

A Deus.....que com esta experiência e sempre, me deixa ver que Ele existe.

Sem dúvida à artífice da minha vida... a uma mulher que é tudo para mim, a quem me esperou e hoje me acompanha com amor infinito, a quem finalmente devo tudo o que sou....a minha mãe, o que mais amo na minha vida..... “un día voy a ser como ud”.

Ao meu Pai, pela grande paciência....porque ele é uma mãe!!!.

Aos meus irmãos “los nenês”, porque choramos junto há pouco tempo por ter deixado de ser a meia dúzia que um dia fomos, mas aprendemos que é mais importante ser uma família só, sem pensar em números.

Ao Efren, porque lá onde ele está, ele falou com Deus e me abriu a porta!

A minha amada sobrinha Maria Camila.

A minha mãe Elvia, Yolima e Jairo, por ser a minha outra família e me apoiar sempre.

Às minhas grandes amigas Marcela, Andreita, Pilar, por estar sempre comigo, aonde eu vou, por me emprestar seu ombro e me fazer rir tanto na vida.

Ao Andrés, por ter ido do meu lado, por acreditar em mim, por me amar, por tantas histórias junto e pelas que faltam.

Ao Brasil, porque me mostrou que é mais do que carnaval, futebol.

À Patricia, porque em verdade é a minha irmã e, além disso, me deu sua família e hoje ocupam um grande espaço no meu coração.

À Elisa Maria, por ter virado a minha mãe Brasileira, amo seus abraços.

Aos Colombianos residentes em Jaboticabal: À Ednita, que foi o meu anjo no Brasil, ao Giovanni que fez crescer o meu amor pela medicina dos animais, ao Miguel por ser o meu fiel amigo e companheiro, ao Ricardo, por ter sido o meu

apóio em tudo e não me deixar sozinha; ao Iván, que me ensinou que é possível errar e perdoar, mas sempre sorrir.

À equipe da oftalmo: Alexandre, Luciano, Patrícia, Miguel, Iván, Roberta, Kethye, Verinha (quase oftalmo), pela paciência para me ensinar e a confiança depositada. Hoje vocês são parte da melhor parte da minha vida.

Ao Professor Alexandre, pelo ensino, porque é talvez o melhor Professor que eu já conheci e, além disso, virou o meu grande amigo.

À Adriana, que foi mais do que a minha co-orientadora, foi a minha amiga nos momentos difíceis e é uma mulher que admiro como profissional e como pessoa. Por me ajudar tanto e por me dedicar tempo e conversar comigo a respeito do Loirinho no chat. Por ter depositado tanta confiança em mim e me chamar para me co-orientar, jamais esqueço esse dia.

Ao Professor Laus, pela confiança e paciência, por tantos conselhos, mas sempre, pela oportunidade que me deu de entrar na FCAV.

À FCAV, ao hospital, estagiários, funcionários, professores, todos sempre disponíveis para ajudar.

À FAPESP pelo auxílio para a pesquisa.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado.

DEDICO,

A minha mãe, porque sua força me fez forte!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	7
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1 Considerações quanto à ética	8
4.2 Pacientes.....	8
4.3 Ulceração corneal induzida por álcali.....	9
4.4 Soluções oftálmicas.....	10
4.5 Delineamento experimental e protocolos terapêuticos.....	10
4.6 Critérios de avaliação.....	11
4.6.1 Tempo de reepitelização.....	11
4.6.2 Zimografia em gel.....	12
4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	14
4.7 Análise estatística.....	15
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Reepitelização.....	17
5.2 Zimografia em gel.....	21
5.2.1 MMP-2 ativa.....	21
5.2.2 MMP-2 latente.....	23
5.2.3 MMP-9.....	25
5.3 Microscopia eletrônica de varredura: microvilosidades.....	27
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

GC	Grupo controle
MMPs	Metaloproteinases de matriz estromal
TIMPS	Inibidores tisulares de metaloproteinases de matriz estromal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
NAC	N-acetilcisteína
SC	Sulfato de condroitina
GC	Grupo controle
NaOH	Hidróxido de sódio
MEC	Microvilosidades epiteliais corneais
CEM	Corneal epithelial microvilli
NaCl	Solução salina 0,9%
°C	Graus Celsius
V	Voltios
Psi	Pound force per square inch: libras por polegada quadrada absoluta
kV	Kilovoltios
μm^2	Micrometros quadrados
UDA	Unidade densitométrica arbitraria

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Imagem fotográfica ilustrando úlcera corneal por NaOH 1N em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto. Notar área ulcerada regular em região axial (seta) Jaboticabal, SP, 2011..... 9
- Figura 2. Quantificação da área ulcerada com *software* específico, em olho esquerdo de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto. Em A, a área ulcerada em verde circundada (seta branca) com auxílio da ferramenta *free hand selections*. Em B, e quantificação numérica da área (seta preta). Jaboticabal, SP, 2011..... 12
- Figura 3. Quantificação da densidade das microvilosidades, em *software* específico, em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com Sulfato de condroitina 3% ou com solução salina. As imagens mostram as microprojeções como pontos pretos (seta vermelha). Com auxílio da ferramenta *Analyze/ Analyze particles*, os pontos foram quantificados numericamente (seta azul). Jaboticabal, SP, 2011..... 15
- Figura 4. Imagens fotográficas ilustrando a progressão da reparação corneal até a sua reepitelização, em olhos de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com Sulfato de condroitina 3% ou com Solução salina. Jaboticabal, SP, 2011..... 17

- Figura 5. Média e erro padrão dos valores correspondentes à redução da área corneal ulcerada de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína ou com Sulfato de Condroitina ou com Solução salina imediatamente à ocorrência das úlceras e nos respectivos períodos, até a reepitelização corneal, Jaboticabal, SP, 2011..... 18
- Figura 6. Média e erro padrão* dos valores correspondentes ao tempo de reepitelização em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com sulfato de condroitina 3%, ou com N-acetilcisteína 3% ou com solução salina. Jaboticabal, SP, 2011..... 19
- Figura 7. Gel de poliacrilamida, enriquecido com gelatina, mostrando bandas de metaloproteinases ativas e latentes, de córnea de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos e saudáveis decorridas 20 e 42 horas da ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1%, ou com N-acetilcisteína 10% ou com Sulfato de condroitina 3% ou com Solução salina. Observar bandas de maior densidade para a forma ativa (92kDa) da MMP-9 e para as formas latente (72kDa) e ativa (62kDa) da MMP-2. Jaboticabal, 2011..... 21
- Figura 8. Média e erro padrão* dos valores correspondentes à quantificação de MMP2 ativa em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina, comparadas com córneas saudáveis da mesma espécie.

- Jaboticabal, SP, 2011..... 22
- Figura 9. Média e erro padrão dos valores correspondentes à quantificação de MMP2 latente em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1%, ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina, comparadas com córneas saudáveis da mesma espécie. Jaboticabal, SP, 2011..... 24
- Figura 10. Média e erro padrão dos valores correspondentes à quantificação de MMP9 em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 2 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1%, ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina. Jaboticabal, SP, 2011..... 26
- Figura 11. Eletronmicrografia de varredura de córnea de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto, 42 horas após abrasão química com NaOH 1N. Em A, superfície corneal de olho tratado com EDTA 1%. Em B, com N-acetilcisteína 10%, em C com Sulfato de condroitina 3% e em D com Solução salina. Observar as microvilosidades (setas) dando um aspecto aveluado nas células. Jaboticabal, SP, 2011..... 28
- Figura 12. Média e erro padrão dos valores correspondentes ao número de microvilosidades por μm^2 , em córnea de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 42 horas após ulceração química com NaOH 1mol/L, tratados com EDTA 1%, ou com N-acetilcisteína ou com sulfato de condroitina ou com Solução salina. Jaboticabal, SP, 2011..... 29

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1. Estatística descritiva das porcentagens de área ulcerada e reepitelização em tempo (horas), em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina. Jaboticabal, SP, 2011..... 20
- Tabela 2. Estatística descritiva* do tempo de reepitelização de úlceras corneais (horas) em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com Sulfato de condroitina 3%, ou com N-acetilcisteína 10%, ou com solução salina. Jaboticabal, SP, 2011..... 20
- Tabela 3. Estatística descritiva dos valores de MMP-2 ativa, em unidade densitométrica arbitrária, em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina, comparados com córnea saudável da mesma espécie. Jaboticabal, SP, 2011..... 23

- Tabela 4. Estatística descritiva dos valores de MMP-2 latente em unidade densitométrica arbitrária em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratadas com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina, comparados com córneas saudáveis. Jaboticabal, SP, 2011..... 25
- Tabela 5. Estatística descritiva dos valores de MMP-9 latente em unidade densitométrica arbitrária em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% (SC) ou com solução salina. Jaboticabal, 2011..... 26
- Tabela 6. Estatística descritiva da média e desvio padrão das microvilosidades μm^2 em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar variação *albinus*, tratados com EDTA 1%, ou com N-Acetilcisteína 10%, ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina (Controle), 40 horas após cauterização química com NaOH a 1 mol/L, em ratos Wistar, fêmeas, adultos, comparados com córneas saudáveis da mesma espécie. Jaboticabal, 2010..... 29

**EFEITOS DE PREPARAÇÕES ANTIPROTEOLÍTICAS
NO TRATAMENTO DA CERATITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL EM RATOS
(*Rattus norvegicus* LINHAGEM WISTAR, VARIAÇÃO *albinus*, LINNAEUS, 1758)**

RESUMO - Estudaram-se os efeitos do sulfato de condroitina 3% (SC), da N-acetilcisteína 10% (NAC), do EDTA 1% (EDTA) e solução salina (GC), sobre a viabilidade do epitélio corneal e a concentração de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), em córneas de ratos submetidos à ulceração química por NaOH 1N. Compuseram-se quatro grupos de vinte e quatro animais, que foram submetidos à queimadura química corneal com NaOH 1N. Os tratamentos foram realizados a intervalos de 6 horas e as córneas fotografadas, nos mesmos períodos, após tingimento com fluoresceína, até a reepitelização. Doze animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia humanitária, 20 horas após ulcerações. O mesmo procedimento foi repetido às 42 horas para os outros doze animais de cada grupo. As córneas foram processadas para quantificação de microvilosidades do epitélio corneal por microscopia eletrônica de varredura e para quantificação da MMP-2 e -9, por zimografia. O tempo médio de epitelização em horas foi de $28,00 \pm 12,82$ (SC), $29,00 \pm 11,01$ (NAC), $35,00 \pm 7,01$ (EDTA) e de $35,00 \pm 7,01$ (GC), sem diferença significativa ($p=0,46$) entre os grupos. Não se observou diferença quanto ao número de MEC entre os grupos ($p>0,05$). Às 20 e às 42 horas, a forma latente da MMP-2 foi significativamente mais elevada nos grupos NAC e SC ($p<0,001$), e às 42 horas observou-se maior concentração em EDTA, relativamente ao GC ($p<0,001$). Às 42 horas, a concentração da MMP-2, em sua forma ativa, foi significativamente maior, no grupo SC, relativamente aos demais grupos ($p<0,001$). A MMP-9 só se expressou em sua forma latente, sendo sua concentração significativamente mais elevada, no grupo NAC, às 42 horas ($p<0,001$). Concluiu-se, que das substâncias testadas, só o sulfato de condroitina acelerou a epitelização corneal, mas nenhuma delas apresentou efeitos protetores às microvilosidades do epitélio corneal. As substâncias utilizadas, não mostraram efeito benéfico, quanto à inibição de MMPs, notadamente o sulfato de condroitina 3% e a N-acetilcisteína 10%.

Palavras chave: álcali, ceratite ulcerativa, metaloproteinases, microvilosidades, ratos, zimografia

**EFFECTS OF ANTIPROTEOLYTIC AGENTS USED IN THE TREATMENT
OF EXPERIMENTAL ULCERATIVE KERATITIS IN WISTAR ALBINO RATS (*Rattus
novergicus*)**

SUMMARY - This study aimed evaluate the effects of topical 3% chondroitin sulfate (SC), 10% N-acetylcysteine (NAC), 1% EDTA (EDTA) and 0,9% NaCl on corneal epithelial viability and the expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and -9), in alkali burned rat corneas. Ninety eight healthy rats were divided into four groups and animals were submitted to corneal burn with NaOH 1N. All treatments occurred every 6 hours, and the corneas were photographed at the same time points until lesions were fluorescein negative. Twelve animals of each group were euthanized 24 and 42 hours after burn, and corneas were processed for corneal epithelial microvilli quantification (CEM) by scanning electron microscopy and MMP-2 and -9 evaluation by zimography. Images were quantified by Image J. Average corneal wound healing rate was $28,00 \pm 12,82$ (SC), $29,00 \pm 11,01$ (NAC), $35,00 \pm 7,01$ (EDTA) and $35,00 \pm 7,01$ hours in controls (GC) ($p=0,46$). CEM count did not change significantly among groups ($p>0,05$). At 20 and 42 hours, MMP-2 latent form quantity was significantly increased in NAC and SC groups ($p<0,001$); at 42 hours, MMP-2 latent form was significantly elevated in EDTA, in comparison to GC ($p<0,001$). At 42 hours, MMP-2 active form was significantly increased only in SC ($p<0,001$). MMP-9 was expressed only in its latent form, being significantly higher in NAC, at 42 hours ($p<0,001$). This study indicated that only 3% chondroitin sulfate accelerated corneal wound healing. 10% N-acetylcysteine, 1% EDTA and 3% chondroitin sulfate did not protect the corneal epithelial microvilli. In addition, none of the tested agents showed any benefit over MMPs inhibition in alkali burned.

Key Words: metalloproteinases inhibition, microvilli, rat, ulcerative keratitis, zymography

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Os tecidos orgânicos constituem-se em ambientes dinâmicos, nos quais células residentes interagem reciprocamente com a matriz extracelular. A manutenção da arquitetura dos tecidos é controlada pela atividade coordenada de uma classe de enzimas conhecidas como metaloproteinases de matriz estromal (MMPs) (GROSS & LAPIERE, 1962).

A atividade das metaloproteinases tem sido comprovada em enfermidades e em condições fisiológicas de remodelação tecidual (GROSS, 1981), assim como já fora na córnea (SIVAK & FINI, 2002).

A córnea é composta por cinco camadas: filme lacrimal, epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O estroma corneal apresenta predomínio de fibrilas colágenas (Tipo I e II), queratócitos e fibras nervosas não mielinizadas. A matriz extracelular é constituída por proteoglicanos e suas hastes de glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina, dermatan sulfato, heparan sulfato, queratan sulfato e ácido hialurônico), que participam da manutenção estrutural e funcional da córnea (SLATTER, 1990; BANKS, 1991).

A manutenção e a reparação da matriz estromal decorrem do balanço coordenado entre a síntese, a degradação e a remodelação de seus componentes. Dela participam enzimas proteolíticas, cuja função é controlada por inibidores de proteases. Desequilíbrios entre os níveis de proteases e de seus inibidores podem ensejar degradação patológica do colágeno estromal e dos proteoglicanos (TWINING, 1994; HIBBETS et al., 1999).

Quando a córnea é aviltada, múltiplos sistemas são ativados produzindo alterações e interações celulares mediadas por leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e pela ação combinada de proteinases, fatores de crescimento, citocinas e de outros componentes, cuja atividade visa à reparação da lesão. Decorrem angiogênese, reepitelização, tecido de granulação e deposição de matriz extracelular (WONG et al., 2002).

Proteinases atuam na remodelação do estroma (TWINING, 1994; HIBBETS et al., 1999). Não obstante, elas podem estar envolvidas no agravamento de condições, como nas ceratites ulcerativas (DONZIS & MANDINO, 1987; WILLEFORD et al., 1998; GEERLING et al., 1999).

A perda da continuidade epitelial, ocorrência obrigatória nas ceratites ulcerativas, incita a cascata de eventos celulares e extracelulares voltados ao restabelecimento da integridade tecidual (BERMAN, 1980; FINI & GIRARD, 1990).

Ceratites ulcerativas podem ser classificadas como infecciosas e não infecciosas. As infecciosas têm como agentes envolvidos mais comuns, as bactérias, os vírus e os fungos. Ceratites ulcerativas não infecciosas podem ter origem traumática ou decorrer da ação direta de agentes químicos (WAGONER, 1997; SZUCS et al., 2000; ALBERTI et al., 2001).

Em úlceras corneais químicas, como as induzidas por álcali, proteinases atuam como mediadores da destruição progressiva do estroma (BROWN et al., 1970; PATERSON et al., 1994). No passado, acreditava-se que a fonte primária de proteinases era somente a córnea (FINI & GIRARD, 1990; MATSUBARA et al., 1991). Contudo, pesquisas anteriores, avaliando o papel de polimorfonucleares na degradação do colágeno corneal, mostraram que leucócitos, ao liberarem proteinases, contribuem para a evolução rápida da ceratomalácia (KENYON et al., 1979). TWINING (1994) e KERNACI et al. (1997), reiteraram que proteinases podem ser secretadas por patógenos e atuam agravando o dano tecidual.

Nas ceratites ulcerativas, a expressão de proteinases destrutivas e a redução na atividade de seus inibidores induzem à rápida degradação do colágeno e de outros componentes da matriz estromal (BROWN, 1971; BERMAN, 1980; MATSUBARA et al., 1991; STRUBBE et al., 2000). A evolução da ulceração corneal pode, portanto, ser considerada uma desordem da homeostase entre a atividade de proteinases e de seus inibidores tissulares (TIMPS) (SLANSKY et al., 1969; STRUBBE et al., 2000, BROOKS & OLLIVIER, 2004).

Proteinases são classificadas em metaloproteinases de matriz estromal (MMPs), proteinases séricas, proteinases aspárticas e proteinases cisteínicas. (HIBBETS et al.,

1999; BROOKS & OLLIVIER, 2004). As metaloproteinases constituem, assim, uma família de enzimas que degradam componentes da matriz extracelular e da membrana basal (BIRKEDAL, 1988; WOESSNER, 1998). Elas estão envolvidas em processos fisiológicos e nos patológicos, que incluem a embriogênese, o desenvolvimento e a reparação teciduais, a inflamação e em metástases tumorais (MOSES et al., 1996; WERB, 1997; MADLENER et al., 1998).

As MMPs são enzimas dependentes de cálcio e de zinco e podem de consoante com o substrato que mobilizam, ser classificadas em quatro classes: gelatinases, colagenases, estromelisinases e tipo membrana (NAGASE & OKADA et al., 1997; WOESSNER, 1999).

Pesquisas mostraram a expressão de MMPs em córneas saudáveis e em córneas lesadas, principalmente a MMP-2 e a MMP-9, em seres humanos, em cães, em camundongos, em ratos, em coelhos e em cavalos (KENNEY et al., 1998; YE & AZAR, 1998; CHANDLER et al., 2003; SAKIMOTO, 2003; YANG et al., 2003; KALLBERG et al., 2004; OLLIVIER, 2004; CARTER et al., 2007).

As fontes comuns de MMPs são endógenas (teciduais) e exógenas (produzidas por microorganismos) (REBHUN, 1981; BROOKS, 1999). Reconhece-se que bactérias como *Pseudomonas sp* (BROOKS e OLLIVIER, 2004) e fungos, como o *Aspergillus spp.* e o *Fusarium spp.* são importantes produtores de proteinases (KESSLER et al., 1977; GOPINATHAN et al., 2001).

Metaloproteinases e proteinases séricas preponderam na resolução de lesões da córnea, como já fora descrito em diferentes espécies animais (STRUBBE et al., 2000; CHANDLER, 2003; OLLIVER et al., 2003; SAKIMOTO et al., 2003; MULHOLLAND et al., 2005; CARTER et al., 2007). A MMP-2 e a MMP-9 são as de maior significância nas fases finais da remodelação e da degradação do colágeno estromal (FINI, 1992; MULHOLLAND et al., 2005).

A MMP-2 é sintetizada por ceratócitos estromais e encontra-se na forma inativa no epitélio da córnea intacta e no estroma. Ela realiza funções de vigilância, tornando-se ativa para degradar moléculas de colágeno danificadas resultantes do

envelhecimento natural (FINI, 1990; MATSUBARA, 1991; TWINNING, 1994; YE et al., 1998).

A síntese de MMP-9 se dá em células epiteliais e por polimorfonucleares, quando há lesão corneal. Ela se torna ativa no curso da evolução das lesões corneais, sendo, todavia, indetectável em córneas sadias (FINI, 1990; TWINNING, 1994; YE et al., 1998; WONG et al., 2002).

A MMP-9 degrada a estrutura de adesão da membrana basal das células epiteliais. Ela se torna detectável em ulcerações, retardando a reepitelização (FINI & GIRARD, 1990; MATSUBARA et al., 1991; WONG et al., 2002). BROOKS et al. (2004) e OLLIVIER et al. (2007), condicionaram o sucesso no tratamento das úlceras corneais ao controle vigoroso da atividade de enzimas líticas.

Inibidores de metaloproteinases estão indicados no tratamento de ceratites ulcerativas e na ceratomalácia, para reduzir a progressão da degradação estromal e acelerar a reparação epitelial (BROWN, 1970; BARLETTA et al., 1996; CLARK, 1998; STRUBBE, 2000). Dos considerados inibidores efetivos de MMPs, para uso oftálmico, incluem-se a N-acetilcisteína, o ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), as tetraciclina e o soro sanguíneo (PRAUSE, 1983; TWINNING et al., 1994; HIBBETS et al., 1999; STRUBBE, 2000; BROOKS et al., 2004; OLLIVIER et al., 2007).

O EDTA, as tetraciclina e a N-acetilcisteína são quelantes de cálcio e de zinco, minerais essenciais à atividade e à manutenção da estrutura das proteinases (NAGASE et al., 1997). Por quelar o cálcio, o EDTA interfere com a estabilidade das MMPs e, ao mesmo tempo, suscita a diminuição na migração de polimorfonucleares para a lesão (PFISTER et al., 1984). Preparações de uso local, em concentrações variáveis de 0,05% até 0,2%, são bem toleradas por cães e por equinos (BROOKS, 1999).

A N-acetilcisteína é um inibidor de MMPs comumente utilizado em pacientes humanos e animais (SLANSKY, 1969; BERMAN, 1980; PETROUTSOS et al., 1982; WARD, 1999; KANAO et al., 1993). A instilação local de N-acetilcisteína 10%, tem sido recomendada para cães e para cavalos (WARD, 1999; BROOKS, 1999). PETROUTSOS et al. (1982), ao avaliarem o efeito da N-acetilcisteína em córneas de

coelhos com ulceração corneal, observaram que ao utilizarem-na a 10% ou a 20%, não encontram efeitos adversos quanto à evolução da reparação.

OLLIVIER et al. (2003), notificaram, a partir de estudos *in vitro*, efeitos de inibidores de MMPs sobre a atividade proteolítica do filme lacrimal em cavalos com ceratite ulcerativa. O EDTA, na concentração de 0,2%, reduziu a atividade proteolítica em até 99,4%, seguido pela doxíciclina 0,1%, que o fez em 98,8%, pela N-acetilcisteína 10%, que o fez em 98,9%, pelo soro sanguíneo autógeno, que reduziu em 90,0% e pelo Ilomostato (inibidor sintético de MMPs) 0,1%, em 53,4%.

Estudos comparando-se os efeitos do soro sanguíneo autógeno e da N-acetilcisteína, notadamente quanto a parâmetros clínicos como o blefarospasmo, descarga ocular, hiperemia, quemose e transparência corneal, além da microscopia, não mostraram diferenças significativas, quanto à reepitelização corneal em lesões químicas induzidas (CAMPOS et al., 2003).

BARROS et al. (2007), mostraram que o extrato do vegetal *Potomorphe umbellata* foi capaz de inibir a ação da MMP-2 e da MMP-9, em lesões corneais experimentais de coelhos.

Glicosaminoglicanos foram empregados em oftalmologia veterinária, especialmente para o tratamento do defeito epitelial crônico espontâneo, visando acelerar a reparação corneal (WILLEFORD et al., 1998). Eles são constituintes da matriz extracelular de vários órgãos e participam da reparação tecidual (KATO et al., 2000). Entre os de maior importância na córnea, elencam-se o sulfato de condroitina, o ácido hialurônico, o dermatan sulfato, o queratan sulfato e o heparan sulfato (SORIANO et al., 2001).

O sulfato de condroitina encontra-se em altas concentrações no estroma corneal, contribuindo para sua manutenção, estabilidade, rigidez e transparência (AXELSSON & HEINEGÅRD, 1975). Ele participa da adesão e da migração celulares, da orientação das fibras colágenas e da reparação tecidual (ANDERSON et al., 2000).

Propriedades anti-proteolíticas do sulfato de condroitina foram demonstradas na cartilagem e no líquido sinovial de pacientes humanos. Verificou-se que ele é capaz de inibir enzimas proteolíticas, como colagenases e elastases e de proteger as membranas

celulares da ação dos radicais livres (RONCA et al., 1998). Na osteoartrite, comprovou-se que o sulfato de condroitina inibe a ação de metaloproteinases *in vivo* e *in vitro* (RONCA et al., 1998; SCHLUETER & ORTH, 2002), como resultado da redução da atividade da MMP-9 (ORTH 2002; CHAN et al., 2005).

Relatou-se, em cães, que a combinação de duas soluções contendo diferentes antibióticos e sulfato de condroitina foi capaz de auxiliar na reparação de córneas com defeito epitelial espontâneo crônico (LEDBETTER et al., 2007).

Os efeitos cicatrizantes de uma solução tópica de sulfato de condroitina sobre úlceras por álcali em coelhos, foram avaliados clinicamente por TALIERI et al. (2000). Não se encontraram diferenças clínicas significativas, quando os resultados foram comparados com os de um grupo placebo.

SAKUMA et al. (2000), ao avaliarem o efeito do hialuronato de sódio sobre a expressão das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), em córneas de coelhos que passaram por ceratectomia lamelar, observaram elevação na atividade enzimática, principalmente da MMP-9, sem retardo da reepitelização corneal.

De acordo com OLLIVIER et al. (2003), para se avaliar a atividade das MMPs, a zimografia em gel e a imunistoquímica seriam as técnicas mais recomendadas para avaliar a MMP-2 e a MMP-9.

A zimografia é uma técnica eletroforética que permite observar a atividade das proteases. É considerada uma técnica simples, sensível, quantificável e funcional para a análise de atividade proteolítica em células e extratos celulares (HEUSSEN & DOWDLE, 1980). Esta técnica permite o estudo de enzimas que degradam matriz extracelular, particularmente, as metaloproteinases (VISSE & NAGASE, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Ceratites ulcerativas requerem, para o seu tratamento, o controle copioso da atividade de enzimas líticas. Protocolos terapêuticos habitualmente incluem substâncias como a N-acetilcisteína, o EDTA, o soro sanguíneo e os glicosaminoglicanos, notadamente o sulfato de condroitina, cujos efeitos sobre a epitelização são considerados benéficos, mas sua real ação sobre as metaloproteinases não é completamente conhecida, sendo motivo de novas e originais investigações.

Poucas pesquisas *in vivo*, em pacientes com ulcerações corneais, comparando o efeito dos inibidores de metaloproteinases têm sido realizadas para se avaliarem protocolos terapêuticos, embora, efeitos *in vitro* ou em animais sadios permitiram formar um consenso que substâncias como o EDTA 1%, a N-acetilcisteína e o soro sanguíneo são eficientes na inibição da expressão das MMPs.

Por tais razões, motivou-se realizar a pesquisa *in vivo* para comparar resultados, quanto ao emprego de agentes reconhecidos como inibidores de MMPs e avaliar os efeitos antiproteolíticos do sulfato de condroitina na córnea de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*) submetidos à ulceração corneal com NaOH 1N.

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos antiproteolíticos do sulfato de condroitina 3%, da N-acetilcisteína 10% e do EDTA 1% sobre o processo de reepitelização após ulcerações corneais induzidas por queimadura química com NaOH 1N, empregando técnicas de zimografia em gel para detecção de MMPs, bem como a microscopia eletrônica de varredura para o quantitativo de microvilosidades das células epiteliais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações quanto à ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal sob protocolo nº 028628-08. Por oportuno, cabe ressaltar que 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, de consoante com o código de NÜREMBERG (GOLDIM, 1995).

4.2 Pacientes

Empregaram-se 98 ratos Wistar (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*), clinicamente hípidos, fêmeas, com idades entre dois e três meses, e pesos entre 250 e 300 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista-UNESP- Campus de Botucatu.

Os exames oftálmicos prévios consistiram da biomicroscopia com lâmpada em fenda¹ e do teste de tingimento pela fluoresceína². Selecionados, os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, higienizadas e em ambiente ventilado, recebendo ração comercial³ e água potável *ad libitum*.

¹ Slit Lamp SL-14 – Kowa Company Ltda.

² Fluoresceína strips – Ophthalmos Ltda.

³ Nuvilab CR1- Nuvital Nutrientes S.A. Colombo-PR-Brazil

4.3 Ulceração corneal induzida por álcali

Os animais foram anestesiados com uma solução de 50 mg/kg de cloridrato de cetamina⁴ e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina⁵ (MOHAN et al., 2008), aplicada pela via intraperitoneal. Instilou-se uma gota de colírio de proximetacaína⁶ no olho esquerdo para uma melhor analgesia, imediatamente antes da aplicação local do álcali. Procedeu-se a antissepsia da córnea, do saco conjuntival e da conjuntiva com solução fisiológica acrescida de polivinil-pirrolidona, na proporção 1:50.

Para a obtenção das úlceras, um fragmento de papel filtro⁷ embebido em hidróxido de sódio (NaOH) 1N, cortado de forma circular com trépano de 2mm, foi aplicado diretamente sobre a região axial da córnea esquerda por 60 segundos. Posteriormente, a superfície ocular foi copiosamente lavada com solução salina 0,9%, durante um minuto e obteve-se como resultado, uma úlcera corneal regular (Figura 1). Os procedimentos foram realizados sob magnificação, com lupa de pala⁸.

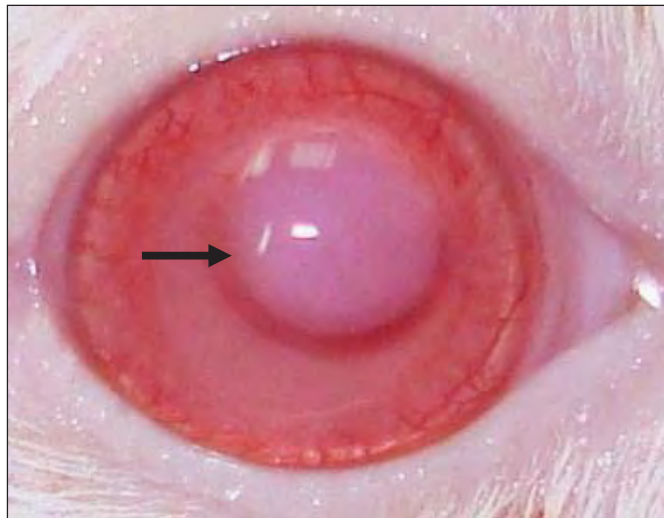


Figura 1. Imagem fotográfica ilustrando úlcera corneal induzida por NaOH 1N em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto. Notar área ulcerada regular em região axial (seta). Jaboticabal, SP, 2011.

⁴ Dopalen® – Vetbrands, Brasil.

⁵ Sedazine® – Fort Dodge, Brasil

⁶ Anestalcon, Alcon, São Paulo, Brasil.

⁷ Papel filtro quantitativo - Wathman No 42

⁸ Lupa de pala Optivisor® DA 04/ 2,0X

4.4 Soluções oftálmicas

Soluções oftálmicas de sulfato de condroitina 3%, N-acetilcisteína 10% e EDTA 1%, foram manipuladas industrialmente, por fabricante reconhecido⁹. As soluções foram estocadas por até trinta dias à temperatura de 4°C e protegidas da luz.

4.5 Delineamento experimental e protocolos terapêuticos

Constituíram-se quatro grupos de vinte e quatro animais, que tiveram a córnea esquerda submetida à ulceração química com NaOH 1N.

Dois animais foram mantidos sob as mesmas condições, sem ulceração ou tratamento, para que as suas córneas fossem utilizadas como basal no teste de zimografia e microscopia eletrônica de varredura.

O primeiro grupo foi tratado com EDTA 1%¹⁰ (EDTA) (COUTURE et al., 2006), o segundo, com sulfato de condroitina 3%¹¹ (SC), o terceiro com N-acetilcisteína 10%¹² (NAC). Um quarto grupo foi utilizado como controle e tratado com solução salina 0,9% (GC). Todas as substâncias foram instiladas a um volume de 30 µl intercalados de seis horas, até a reepitelização das lesões.

As córneas lesadas foram avaliadas à biomicroscopia com luz em fenda e filtro azul cobalto, após instilação de fluoresceína¹³, a cada seis horas, pelo mesmo observador, desde o momento da confecção das úlceras, até a sua reepitelização (fluoresceína negativo).

Decorridas 20 horas das lesões, 12 animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia humanitária com pentobarbital sódico¹⁴ 120mg/kg (CLOSE et al., 1997) e tiveram seus olhos colhidos para avaliação do tecido corneal. O mesmo se repetiu para os outros 12 animais de cada grupo, que tiveram suas córneas colhidas às 40-42 horas

⁹ Ophthalmos, São Paulo, Brasil

¹⁰ EDTA 1%-Ophthalmos, São Paulo, Brasil

¹¹ Sulfato de Condroitina- Ophthalmos, São Paulo, Brasil

¹² N- Acetilcisteína 10%- São Paulo, Brasil

¹³ Fluoresceína *strips* – Ophthalmos Ltda.

¹⁴ Hypnol® Syntec, Brasil.

após a queimadura com álcali (teste da fluoresceína negativo). Uma córnea e meia foi levada a freezer a -70°C para posterior zimografia, enquanto que meia córnea foi fixada em glutaraldeído para avaliação por microscopia eletrônica de varredura.

4.6 Critérios de avaliação

4.6.1 Tempo de reepitelização

As córneas foram avaliadas à biomicroscopia com luz em fenda e filtro azul cobalto, antes e após instilação de fluoresceína, a cada 6 horas, pelo mesmo observador, imediatamente à sua concepção, até o teste resultar negativo. Para o monitoramento da evolução, quanto à reepitelização, os olhos foram fotografados¹⁵, com filtro azul cobalto, sem auxílio de *flash*, a uma distância focal fixa de quatro centímetros. As imagens fotográficas foram avaliadas em *software* específico,¹⁶ para a quantificação da área ulcerada e da sua evolução (STERN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2008).

Após a seleção das imagens (ferramenta *File/Open...*), a área ulcerada foi circundada com auxílio da ferramenta *free hand selections* e o valor obtido (*Analyze/Measure*), tabulado para estudo estatístico (Figura 2).

¹⁵ Cybershot 7.1® Sony do Brasil, Sao Paulo, SP, Brasil

¹⁶ Image J, disponível em_ <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

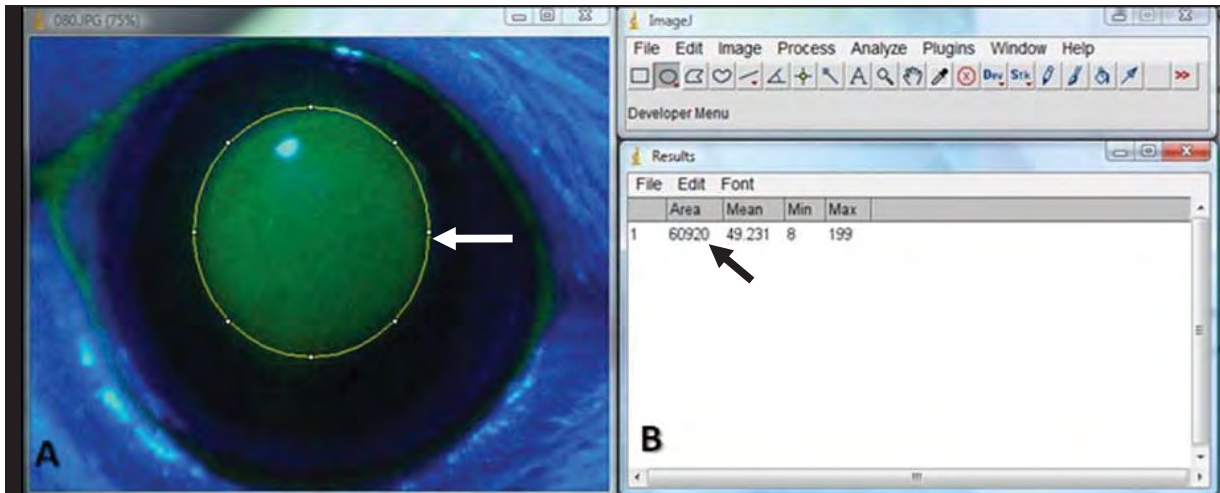


Figura 2. Quantificação da área ulcerada com *software* específico, em olho esquerdo de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto. Em A, a área ulcerada em verde circundada (seta branca) com auxílio da ferramenta *free hand selections*. Em B, quantificação numérica da área (seta preta). Jaboticabal, SP, 2011.

4.6.2 Zimografia em gel, densitometria e análise de imagens

A análise das amostras por zimografia em gel foi desenvolvida no Laboratório de imunologia do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Visando à realização da zimografia em gel enriquecido com gelatina (MMP-2, MMP-9), tornou-se necessária a criação de um "pool", concebido com a córnea de um animal e meia de outro indivíduo do mesmo grupo, para que se atingisse a quantidade mínima de proteína necessária à realização dos testes. As córneas foram levadas a congelamento em freezer a -70° , perfazendo um total de seis amostras por cada grupo.

Após descongeladas, as córneas foram maceradas à 20.000 rotações por minuto, empregando-se um polytron¹⁷, durante 60 segundos, em solução tampão¹⁸. Após a maceração, realizou-se incubação, por 2 horas, a 4°C e 4000 rotações por minuto, coletando-se o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 1/3 do volume do tampão de extração¹⁹, levado a aquecimento, por 5 minutos a 60°C , e centrifugado por

¹⁷ Polytron® PT 2100- Kinematica AG, Switzerland

¹⁸ Solução tampão- Laboratório de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

¹⁹ Tampão de extração- Laboratório de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

20 minutos a 4°C e 4000 rpm, para se coletar o sobrenadante. Os dois extratos foram, posteriormente misturados, e o quantitativo de proteína determinado empregando-se o método Bradford (BRADFORD, 1976).

As amostras foram aplicadas em gel de corrida contendo gelatina. Utilizaram-se 25 µg de proteína em cada poço, aplicando-se as amostras diluídas 1:1 em tampão de amostra²⁰. Ato contínuo, a cuba foi preenchida com tampão de corrida²¹ a 150 V e 4°C. Posteriormente, os géis foram lavados duas vezes (20 minutos cada lavagem) em tampão de lavagem²². Foram incubados com o tampão de incubação²³, por 20 a 24 horas a 37°C, sob agitação, para a renaturação das MMPs e digestão do substrato. Uma vez finalizada a incubação, os géis foram corados com solução de Comassie Blue²⁴, até que se obtivesse a tonalidade azul escura no gel, visando-se a maximizar o contraste entre as áreas de lise e as não digeridas. A seguir, os géis foram clareados, tingidos e incubados durante uma hora. Posteriormente, eles foram preservados em solução de metanol 30% e glicerol 3% diluídos em água.

A atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 foi quantificada por análise da distância entre a migração das bandas no gel, o peso molecular e o padrão de MMPs. A densidade óptica dos zimogramas foi escaneada, digitalizada, levada a densitômetro de imagens e analisada em *software* específico²⁵.

²⁰ Tampão de amostra- Laboratório de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

²¹ Tampão de corrida- Laboratório de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

²² Tampão de lavagem- Laboratório de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

²³ Tampão de incubação- Laboratório de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

²⁴ Comassie blue- Bio Rad Laboratories

²⁵ Scion Image, disponível em www.scioncorp.com

4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi desenvolvida nos próprios do Laboratório de microscopia eletrônica da FCAV-UNESP.

As córneas foram fixadas em glutaraldeído 3%, em tampão fostato de sódio 0,1M pH 7.4, por 48 horas e, posteriormente, lavadas em tampão fosfato. A seguir, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, por 4 horas, e desidratadas em soluções alcoólicas crescentes de 30%, 50%, 70%, 80% 90% e 100%, intercaladas de 20 minutos. Posteriormente, elas foram secas em secador de ponto crítico, a 37°C e pressão de 1500 PSI, por 20 minutos. Realizou-se a metalização em ouro paládio, a fim de tornarem as amostras eletricamente condutivas. As avaliações foram feitas com acelerações de 15 a 20 kV, em aumentos de 750 a 5000 vezes. Imagens fotográficas foram impresas em papel térmico¹⁶ e escaneadas em vídeo impressora¹⁷. Cinco imagens foram capturadas aleatoriamente de cada amostra, na região central da córnea, com aumento de 5000 vezes, para quantificação da densidade das microvilosidades. A densidade foi quantificada segundo Julio et al. (2008). Após a seleção da imagem (ferramenta *File/Open*), a mesma foi binarizada (*Process/Make binary/watershed*). Partículas em preto (Figura 3) representam as projeções das microvilosidades, quantificadas após seleção da ferramenta (*Analyze/ Analyze particles*), sendo o seu tamanho fixado em 9 megapixels-infinito. Os valores obtidos foram convertidos, por regra de três simples, em μm^2 .

¹⁶ Papel Térmico Mitsubishi K65 HM.

¹⁷ Vídeo Impressora Mitsubishi P90W.

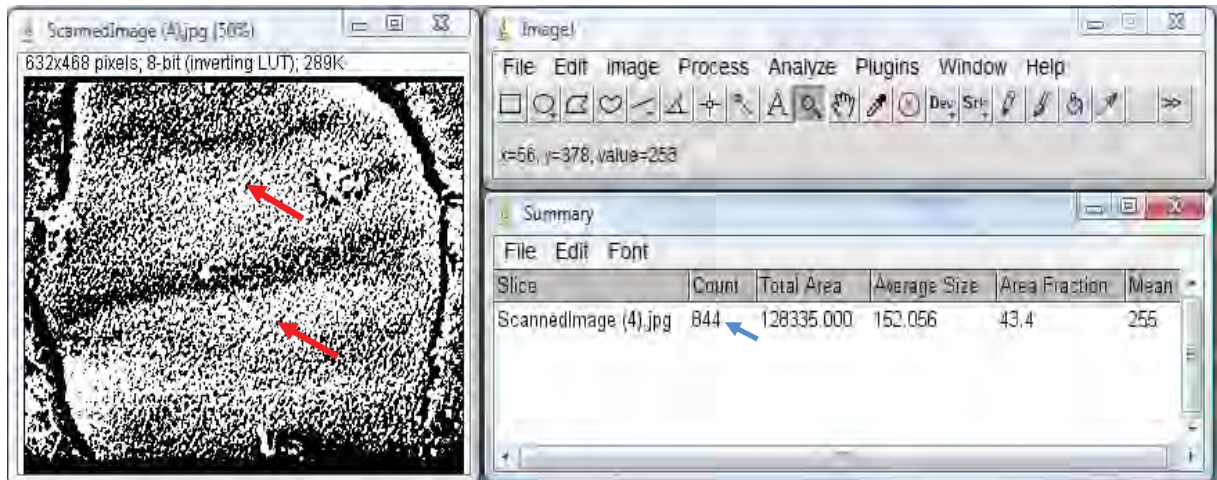


Figura 3. Quantificação da densidade das microvilosidades, em *software* específico, em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina. As imagens mostram as microprojeções como pontos pretos (seta vermelha). Com auxílio da ferramenta *Analyze/ Analyze particles*, os pontos foram quantificados numericamente (seta azul). Jaboticabal, SP, 2011.

4.7 Análise estatística

Os parâmetros de avaliação desta pesquisa foram: reepitelização (área ulcerada em micrômetros e tempo de reepitelização), zimografia em gel (unidades densitométricas arbitrárias) e microscopia eletrônica (microvilosidades μm^2).

Todos dados foram avaliados, quanto à sua normalidade, ao teste de Kolmogorov-Smirnov.

A reepitelização foi analisada empregando-se o teste Kruskal-Wallis seguido do *Dunn's Test*. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

Para a zimografia, empregou-se análise de variância de um delineamento inteiramente casual, com tratamentos no esquema fatorial 5x2, em seis repetições. Comparações, quanto às médias, foram feitas aplicando-se o teste Bonferroni. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Relativamente à microscopia eletrônica, empregou-se análise de variância de um delineamento inteiramente casual, com tratamentos no esquema fatorial 5x1, em seis

repetições. As médias foram comparadas empregando-se o teste Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Os resultados (média e desvio padrão) e os gráficos foram preparados em *Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA)* e em *Software Minitab Statistical Software*.

5. RESULTADOS

5.1 Reepitelização

Relativamente ao diâmetro da área ulcerada, seis horas após ulceração corneal, o diâmetro da lesão aumentou significativamente (25%) em todos os grupos ($p \leq 0,05$), quando comparado com o tamanho da lesão original (Figura 4).

Nas avaliações, quanto ao tamanho das úlceras as 6 e às 18 horas, encontrou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$). Houve redução média em todos os grupos, da ordem de 33,6%. Decorridas 24 horas e até que se atingissem 42 horas, não se encontrou diferença significativa quanto ao tempo de reepitelização entre os grupos. A redução do tamanho da úlcera, nestes momentos (entre 24 e 42 horas) foi de 5,45% (Tabela 1).

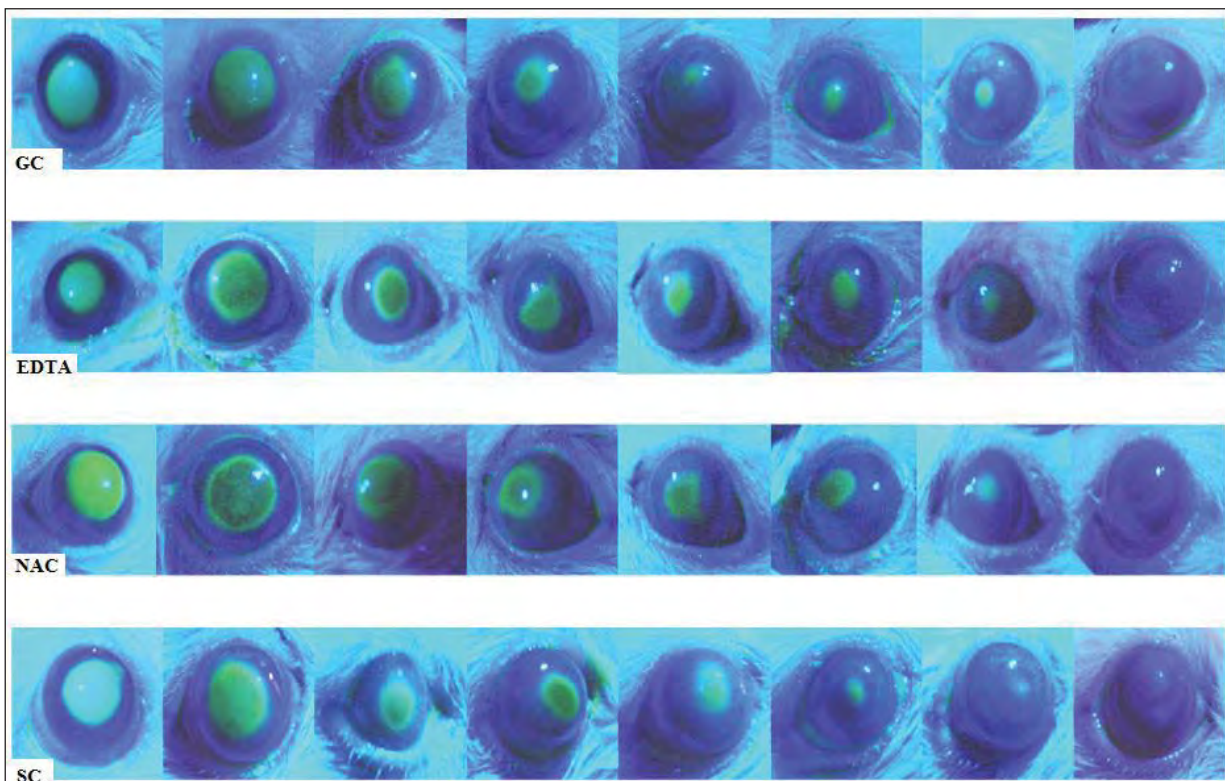


Figura 4. Imagens fotográficas ilustrando a progressão da reparação corneal até a sua reepitelização, em olhos de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N tratados com EDTA 1% ou com N-Acetilcisteína 10% (NAC) ou com sulfato de condroitina 3% (SC) ou com solução salina (GC). Jaboticabal, SP, 2011.

Da avaliação quanto à reepitelização em cada grupo estabelecido, nos diferentes tempos de avaliação, encontrou-se diferença estatística ($p \leq 0,05$). No grupo tratado com o sulfato de condroitina (SC) ($14,29\% \pm 7,92$) e no grupo tratado com solução salina (GC) ($13,95\% \pm 7,11$) a redução da área ulcerada foi mais acelerada, comparativamente aos grupos onde se empregaram a N-acetilcisteína (NAC) ($13,52\% \pm 12,77$) e o EDTA ($13,47\% \pm 13,98$) (Figura 5).

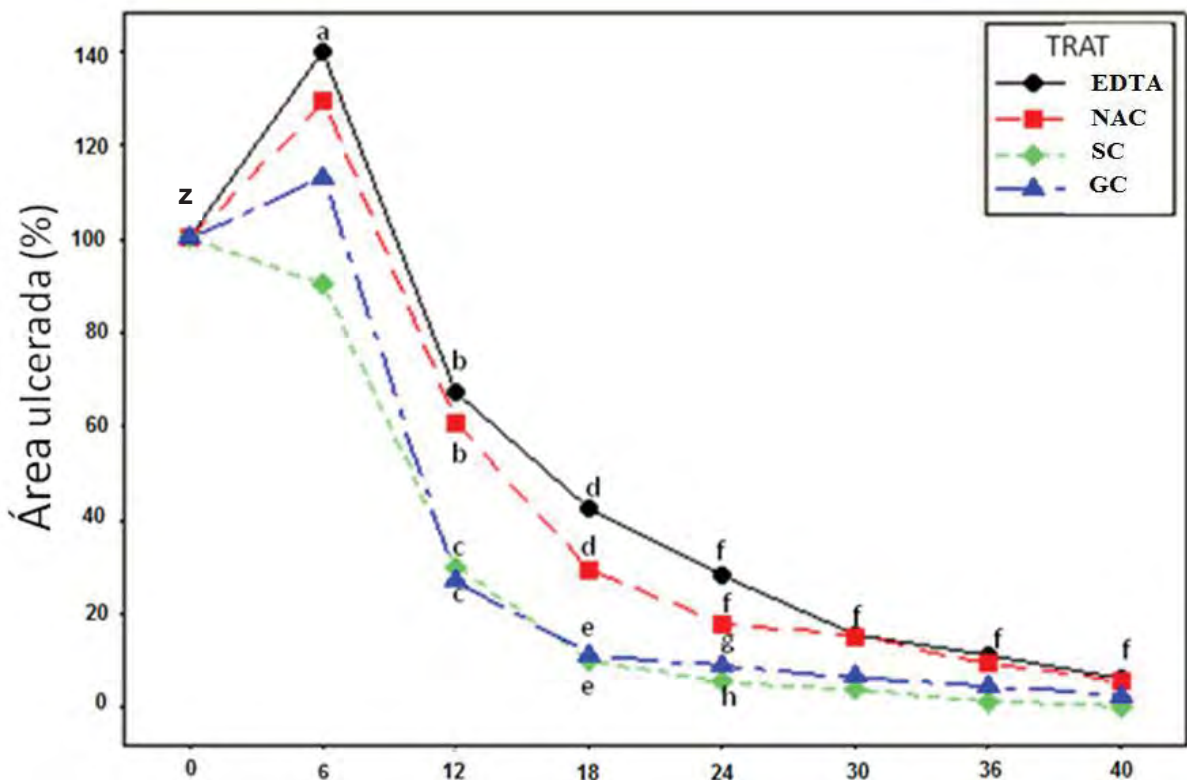


Figura 5. Média e erro padrão* dos valores correspondentes à redução da área corneal ulcerada de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína ou com sulfato de condroitina ou com solução salina, imediatamente à ocorrência das úlceras e nos respectivos períodos, até a re-epitelização corneal. Jaboticabal, SP, 2011.

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

O tempo médio de reepitelização total em horas e em cada grupo, foi de 28 horas nos animais tratados com sulfato de condroitina (SC), 29 horas nos tratados com N-acetilcisteína (NAC), 35 horas nos tratados com EDTA 1% (EDTA) e de 35 horas no grupo Controle (GC), sem diferença significativa entre eles ($p=0.46$) (Figura 6) (Tabela 2).

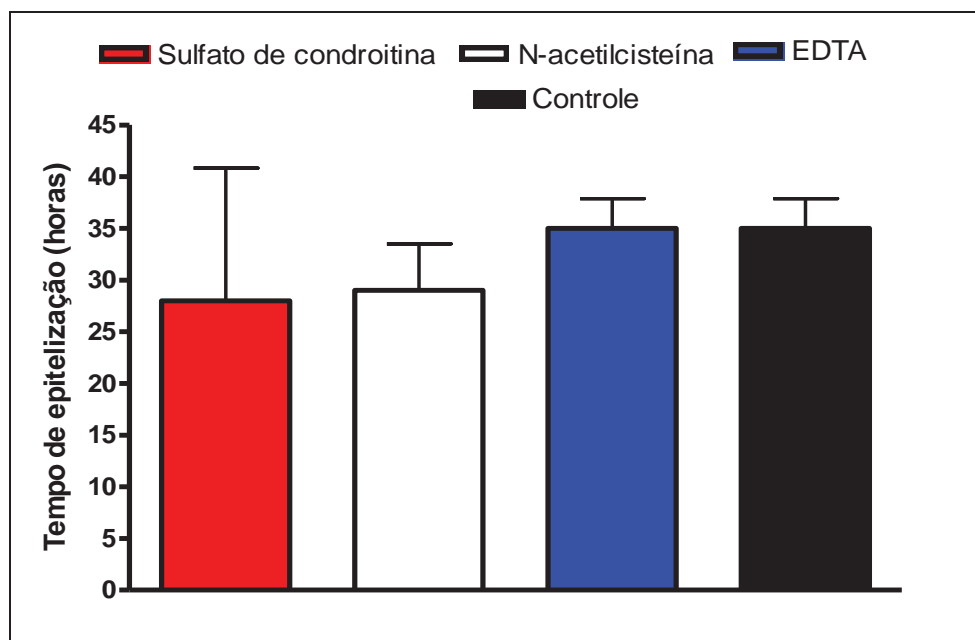


Figura 6. Média e erro padrão* dos valores correspondentes ao tempo de reepitelização em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com sulfato de condroitina 3% ou com N-acetilcisteína 3% ou com solução salina (controle). Jaboticabal, SP, 2011.

*Teste Bonferroni

Tabela 1. Estatística descritiva* das porcentagens de área ulcerada e reepitelização em tempo (horas), em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% (EDTA) ou com N-acetilcisteína 10% (NAC) ou com sulfato de condroitina 3% (SC) ou com solução salina (GC). Jaboticabal, SP, 2011.

HORA	SC	DP	EDTA	DP	NAC	DP	GC	DP
0	100	0	100	0	100	0	100	0
6	90,28	25,74	139,86	31,89	129,32	23,91	113,03	18,74
12	29,85	17,52	67,39	45,35	60,40	13,41	26,76	8,64
18	9,77	6,34	42,49	54,05	29,30	17,07	10,99	4,94
24	5,21	2,24	27,83	46,60	17,66	11,31	8,59	5,38
30	3,56	2,38	15,47	25,97	14,98	9,89	6,24	4,65
36	1,075	1,21	11,11	20,76	9,40	7,47	4,16	4,73
42	0	0	5,73	13,19	5,35	6,33	2,35	2,67

*Teste de Bonferroni, DP: Desvio padrão

Tabela 2. Estatística descritiva* do tempo de reepitelização de úlceras corneais (horas) em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com sulfato de condroitina 3% (SC), ou com N-acetilcisteína 10% (NAC), ou com solução salina (controle). Jaboticabal, SP, 2011.

GRUPOS	Média (horas)	DP	CV
GC	35	7,01	20,04
EDTA 1%	35	7,01	20,04
NAC 10%	29	11,01	37,96
SC 3%	28	12,82	45,79

DP: Desvio padrão, CV: Coeficiente de variação

*Teste Bonferroni

5.2 Zimografia em gel

A forma latente e ativa da metaloproteinase-2 (MMP-2) foi detectada nas córneas de animais saudáveis. Relativamente à MMP-9 latente, encontrou-se expressão em todos os animais do estudo, exceto nos saudáveis (Figura 7).

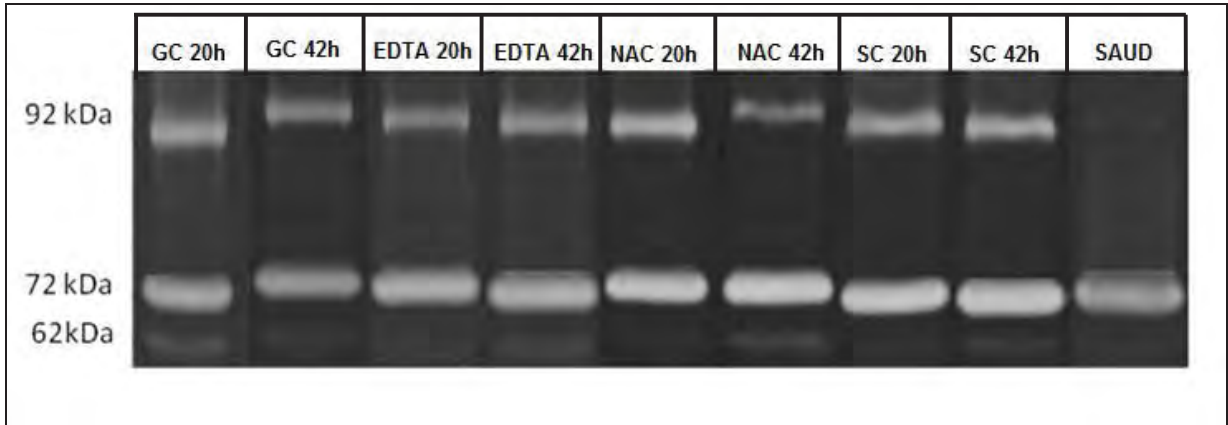


Figura 7. Gel de poliacrilamida, enriquecido com gelatina, mostrando bandas de metaloproteinases ativas e latentes, em córnea de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos e saudáveis decorridas 20 e 42 horas da ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% (EDTA) ou com N-acetilcisteína 10% (NAC) ou com sulfato de condroitina 3% (SC) ou com solução salina (GC). Observar bandas de maior densidade para a forma ativa (92kDa) da MMP-9 e para as formas latente (72kDa) e ativa (62kDa) da MMP-2. Jaboticabal, 2011.

5.2.1 MMP-2 ativa

À avaliação do gel de poliacrilamida, a MMP-2 ativa mostrou bandas de maior densidade no grupo tratado com Sulfato de condroitina 3% e com a N-acetilcisteína, às 42 horas (Figura 7).

Ao se avaliar a expressão de MMP-2 ativa às 20 horas, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) relativamente aos grupos Sulfato de condroitina, N-acetilcisteína e controle, só, quando comparados aos da córnea normal (Figura 8).

Decorridas 42 horas da ulceração, todavia, ao se compararem os grupos EDTA 1%, N-acetilcisteína 10% e Sulfato de condroitina 3% com a córnea saudável, houve

diferença significativa ($p \leq 0,05$), demonstrando valores de expressão desta metaloproteinase mais elevados nas córneas ulceradas.

Quando comparada a expressão da MMP-2 ativa às 42 horas, entre os tratamentos, encontrou-se diferença significativa ($p < 0,01$). O grupo tratado com sulfato de condroitina exibiu valores elevados e diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) dos grupos tratados com N-acetilcisteína 10% e com o EDTA 1%, que se mostraram próximos aos do grupo controle (Figura 8).

Ao comparar a expressão MMP-2 ativa às 20 e às 42 horas, encontrou-se que o grupo tratado com sulfato de condroitina 3% diferiu significativamente dos demais ($p \leq 0,05$). A expressão da enzima no grupo (SC), às 42 horas, foi elevada, comparativamente às 20 horas, demonstrando valores de até 90 unidades densitométricas arbitrárias (UDA), o que difere de forma significativa dos valores encontrados nos demais grupos, onde os valores foram em média 40 UDA (Tabela 3).

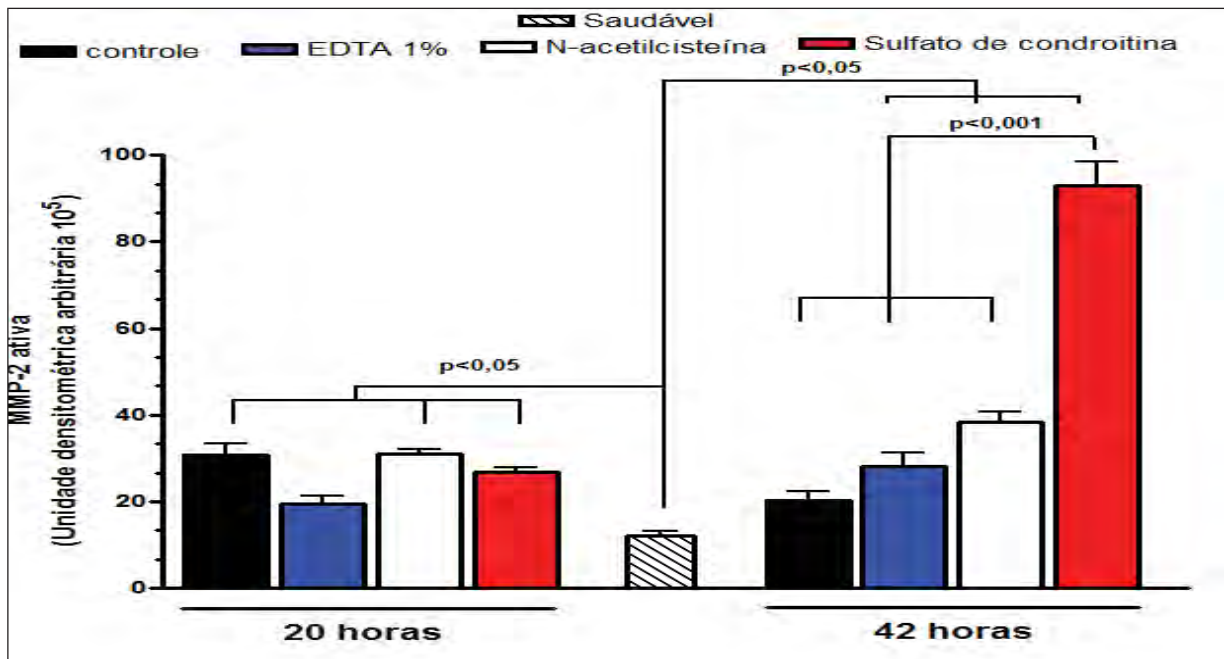


Figura 8. Média e erro padrão* dos valores correspondentes à quantificação de MMP-2 ativa em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação albinus, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina, comparadas com córneas saudáveis da mesma espécie. Jaboticabal, SP, 2011.

*Teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Tabela 3. Estatística descritiva dos valores de MMP-2 ativa, em unidade densitométrica arbitrária, em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-Acetilcisteína 10% (NAC) ou com sulfato de condroitina 3% (SC) ou com solução salina (Controle), comparados com córneas saudáveis da mesma espécie. Jaboticabal, SP, 2011.

GRUPOS	20 HORAS			42 HORAS		
	Média	D.P	C.V	Média	D.P	C.V
Saudável	12,20	34,38	128,98	12,20	2,10	128,98
Controle	30,75	6,40	20,73	22,15	4,61	22,66
EDTA 1%	19,00	4,26	21,82	27,45	7,95	28,35
N-acetilcisteína 10%	30,70	2,32	7,51	37,20	5,88	15,38
Sulfato de condroitina 3%	26,35	2,61	9,74	93,75	13,27	14,28

D.P: Desvio padrão, C.V: Coeficiente de Variação

5.2.2 MMP-2 latente

Valores de MMP-2 latente às 20 horas foram significativamente elevados ($p \leq 0,05$) no grupo tratado com sulfato de condroitina e N-acetilcisteína, quando comparados com a expressão desta enzima no grupo tratado com EDTA 1% e no grupo controle (GC), onde os valores da MMP-2 latente foram menores, e encontrou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) nestes dois últimos grupos quando comparados com a córnea saudável (Figura 9).

Decorridas 42 horas da ulceração corneal, valores de MMP-2 latente mais próximos do basal foram encontrados no grupo tratado com EDTA 1%, não obstante, sem diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Ao se comparar a MMP-2 latente basal (saudável) com o grupo controle (GC), o tratado com N-acetilcisteína 10% e com sulfato de condroitina 3% às 42 horas houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), mostrando uma expressão aumentada desta MMP nestes dois últimos grupos.

Os valores encontrados no grupo tratado com EDTA 1% e solução salina foram significativamente menores, quando comparados com os do sulfato de condroitina 3% e os da N-acetilcisteína 10%, que foram similares.

Ao se comparar o efeito, em separado, de cada substância nos dois tempos avaliados (20 e 42 horas), verificou-se no grupo N-acetilcisteína diferença significativa ($p < 0,05$) às 42 horas, cujos valores foram superiores aos das 20 horas (Tabela 4).

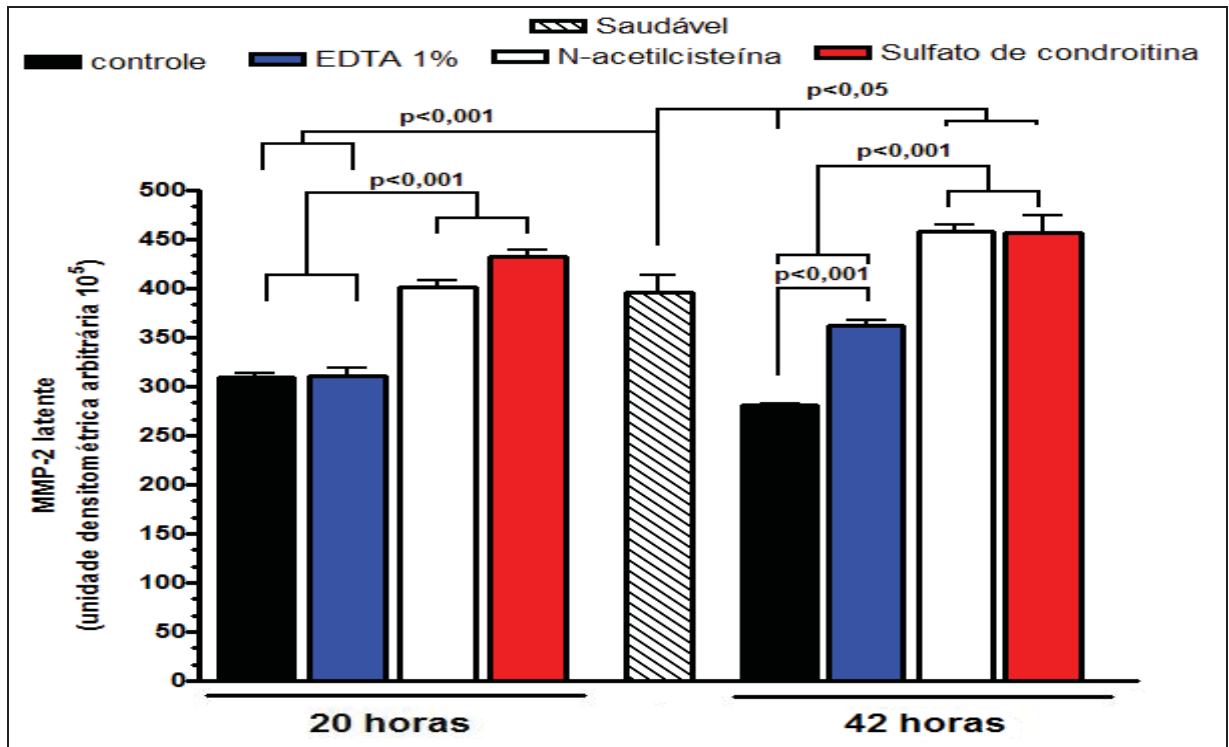


Figura 9. Média e erro padrão* dos valores correspondentes à quantificação de MMP2 latente em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina, comparadas com córneas saudáveis da mesma espécie. Jaboticabal, SP, 2011.

*Teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Estatística descritiva dos valores de MMP-2 latente em unidade densitométrica arbitrária em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH a 1N, tratadas com EDTA 1%, ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com solução salina, comparadas com córneas saudáveis da mesma espécie. Jaboticabal, SP, 2011.

GRUPOS	20 HORAS			42 HORAS		
	Média	D.P	C.V	Média	D.P	C.V
Saudável	382,4	43,31	10,95	382,4	43,31	10,95
Solução salina	306,4	11,64	3,77	281,8	5,94	2,12
EDTA 1%	314,0	18,66	5,99	360,2	14,97	4,13
N-acetilcisteína 10%	399,7	14,42	3,58	458,0	15,44	3,37
Sulfato de condroitina 3%	439,2	18,85	4,36	452,3	41,79	9,14

D.P: Desvio padrão, C.V: Coeficiente de variação

5.2.3 MMP-9

Ao se comparar a expressão da MMP-9 às 20 horas, entre os tratamentos, não se encontrou diferença significativa ($p \geq 0,05$) (Figura 10).

Às 42 horas após ulceração, os níveis de expressão de MMP-9 foram significativamente menores ($p \leq 0,05$) em todos os grupos com exceção do grupo tratado com N-acetilcisteína, quando comparados com os valores encontrados nos grupos às 20 horas. (Tabela 5).

Ao se comparar a expressão da MMP-9 de cada grupo, às 20 e às 42 horas, verificou-se, nos grupos EDTA 1%, sulfato de condroitina 3% e o controle, diferença significativa entre si, decorridas 42 horas. Decorridas 20 horas, os valores foram mais elevados aos encontrados às 42 horas. No grupo N-acetilcisteína 10%, não se encontrou diferença significativa (Figura 10) (Tabela 5).

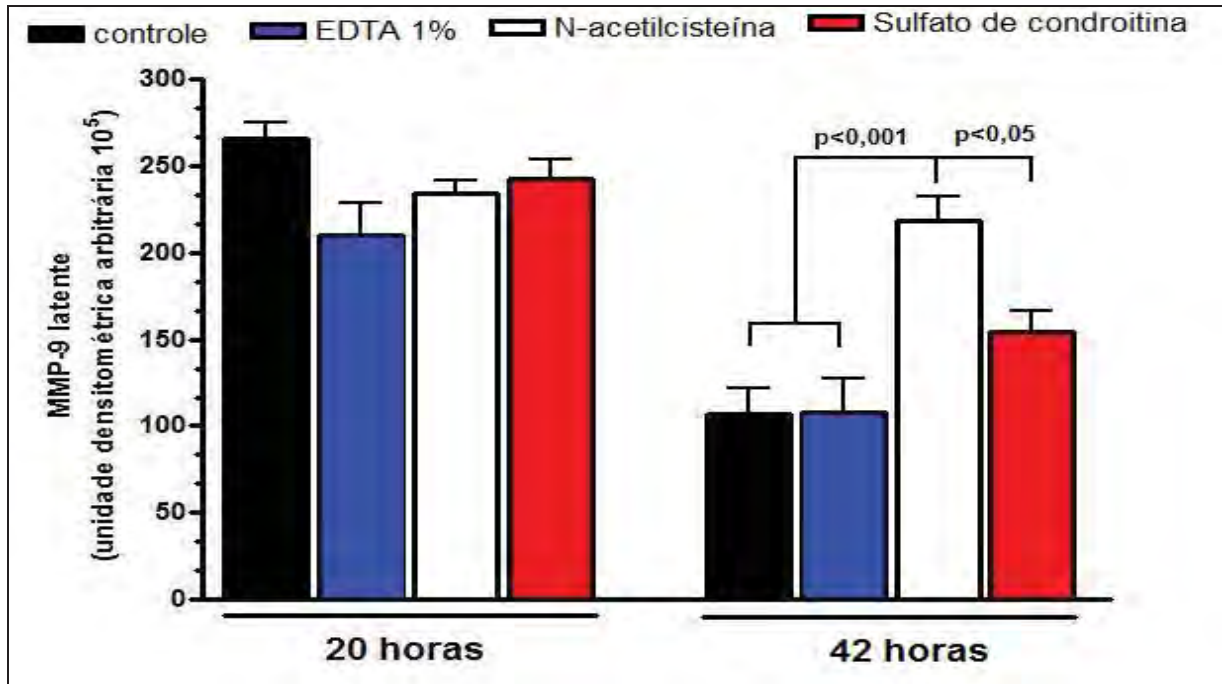


Figura 10. Média e erro padrão dos valores correspondentes à quantificação de MMP9 em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com Na OH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% ou com Solução salina (controle). Jaboticabal, SP, 2011.

Teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Estatística descritiva dos valores de MMP-9 latente em unidade densitométrica arbitrária em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 20 e 42 horas após ulceração química com NaOH a 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína 10% ou com sulfato de condroitina 3% (SC) ou com solução salina (controle). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	20 HORAS			42 HORAS		
	Média	D.P	C.V	Média	D.P	C.V
Controle	268,8	20,54	7,71	94,55	38,30	35,91
EDTA 1%	213,3	46,70	22,26	111,6	47,85	44,38
N-acetilcisteína 10%	235,3	18,39	7,85	226,7	34,95	16,03
Sulfato de condroitina 3%	249,2	25,85	10,64	160,3	30,76	19,96

DP: Desvio padrão, CV: Coeficiente de variação

5.3 Microscopia eletrônica de varredura: microvilosidades corneais

Nas primeiras 20 horas, observou-se epitélio migrando sobre a área ulcerada em todas as córneas. Nos controles, a borda epitelial apresentou-se mais descamada.

Decorridas 42 horas, todas as córneas apresentaram-se reepitelizadas formando um mosaico de células poligonais de tamanhos variados. Nos olhos tratados com sulfato de condroitina 3% ou N-acetilcisteína 10% ou com EDTA 1%, observou-se epitélio com grau de descamação menos acentuado e mais aveludado, comparativamente ao grupo tratado com solução salina (Figura 11).

Observaram-se microvilosidades em células mais claras (com menor reflexo de elétrons), em todos os grupos. Notaram-se, ainda, crateras centrais na maioria das células (Figura 11).

A avaliação da densidade das microvilosidades entre os olhos tratados e os controles não diferiu significativamente ($p \leq 0,05$). Constatou-se um maior número delas nos olhos tratados com N-Acetilcisteína (média 1,39 μm) (Tabela 6) e um menor nos tratados com Sulfato de condroitina (média 0,92 μm) (Figura 12).

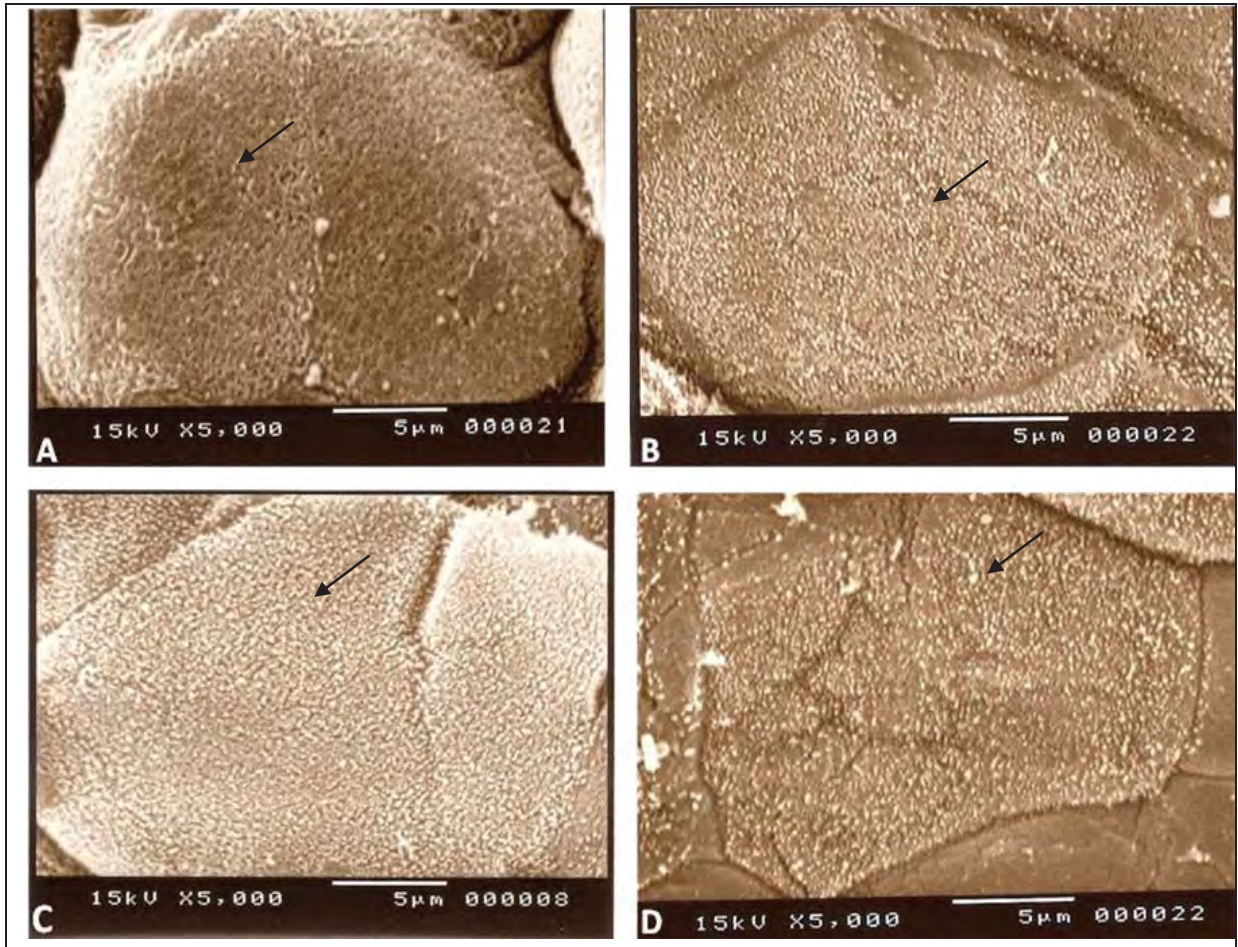


Figura 11. Eletronmicrografia de varredura de córnea de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmea, adulto, 42 horas após abrasão química com NaOH a 1N. Em A, superfície corneal de olho tratado com EDTA 1%. Em B, com N-acetilcisteína 10%, em C com sulfato de condroitina 3% e, em D com solução salina. Observar as microvilosidades (setas) ofertando um aspecto aveludado às células. Jaboticabal, SP, 2011.

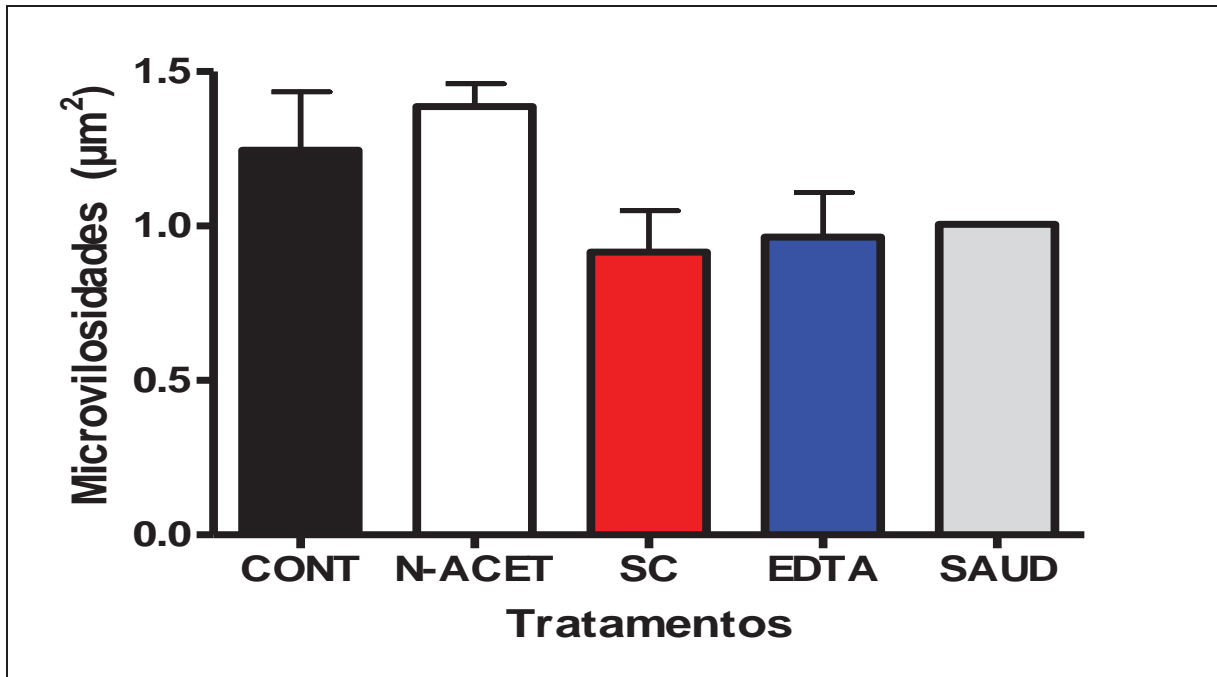


Figura 12. Média e erro padrão dos valores correspondentes ao número de microvilosidades por μm^2 , em córnea de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, variação *albinus*, fêmeas, adultos, 42 horas após ulceração química com NaOH 1N, tratados com EDTA 1% ou com N-acetilcisteína ou com sulfato de condroitina ou com solução salina, comparadas com córneas saudáveis da mesma espécie. Jaboticabal, SP, 2011.

Teste Bonferroni ($p \leq 0,05$)

Tabela 6. Estatística descritiva da média e desvio padrão das microvilosidades μm^2 em córneas de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar variação *albinus*, tratados com EDTA 1%, ou com N-acetilcisteína 10%, ou com sulfato de condroitina 3% ou com Solução salina (Controle), 40 horas após ulceração química com NaOH 1N, em ratos Wistar, fêmeas, adulto, comparadas com córneas saudáveis da mesma espécie s. Jaboticabal, 2011.

Microvilosidades μm^2	Média	D.P	C.V
Controle	1,32	0,46	37,15
EDTA	1,01	0,35	36,74
N-acetilcisteína	1,36	0,18	13,10
Sulfato de condroitina	0,97	0,32	35,77
Saudável	1,00	0	0

DP: Desvio padrão, C.V: Coeficiente de variação

6.0 DISCUSSÃO

Optou-se por se estudarem os efeitos de substâncias antiproteolíticas em ulcerações corneais induzidas por álcali, pela elevada frequência com que cursam. Outrossim, pela importância das metaloproteases e a necessidade de ser controladas em sua ação, por vezes indesejável (STRUBBE et al., 2000; CHANDDLER, 2003; OLLIVER et al., 2003; SAKIMOTO et al., 2003; MULHOLLAND et al., 2005; CARTER et al., 2007).

O modelo experimental de ulcerações corneais induzidas pelo hidróxido de sódio, permite o estudo da atividade proteolítica devido a que o agente penetra rapidamente as camadas da córnea, induzindo intensa reação inflamatória, produção de enzimas proteolíticas, citocinas e perda da sensibilidade corneal (OH et al., 2008).

Do início ao término das avaliações, observou-se perda de transparência da região axial da córnea em todos os olhos avaliados. Provavelmente devido à necrose dos ceratócitos estromais e desorganização das lamelas de colágeno (SAIKA et al., 2005). KATO et al. (2006), informaram que após queimadura com álcali, ocorre a substituição de constituintes da membrana basal, em especial, a fração alfa-5 do colágeno tipo IV, responsável por manter a transparência corneal é substituída por frações alfa-1 e -2, que não se expressam em córneas saudáveis.

Na presente pesquisa, encontrou-se incremento de 25% da área ulcerada às 6 horas pós-lesão, resultante da penetração tecidual do álcali. De forma específica, reconhece-se que o ânion hidróxido (OH⁻) saponifica os ácidos graxos das membranas celulares, com resultante rotura e morte celular (Mc CULLEY, 1987; FREITAS, 1997). O cátion, por sua vez é o responsável da penetração do álcali (Mc CULLEY, 1987), ocasionando finalmente solubilização do epitélio e estroma corneais (KERN, 1990), com aumento da área de desepitelização, exatamente como ocorrera com os animais empregados na nossa avaliação.

A existência de significância estatística no diâmetro da área ulcerada observada entre 6 e 18 horas do início das lesões, encontra amparo no trabalho de ZIESKE & GIPSON (1986), pois, segundo os autores, nesta ocasião ocorre incorporação de

leucina e de glicosaminoglicanos em lesões abrasivas da córnea, ocasionando importante redução da área ulcerada.

Relativamente à taxa de reepitelização corneal o grupo tratado com sulfato de condroitina e o grupo tratado com solução salina apresentaram valores significativos enquanto à redução do diâmetro da área ulcerada. Ao avaliar o tempo total de reepitelização nas córneas tratadas com estas substâncias, foi encontrado que tal ocorreu em tempo ligeiramente menor no grupo tratado com sulfato de condroitina, todavia, sem significância. Efeitos benéficos do sulfato de condroitina têm sido demonstrados e atribuídos a eventos mecânicos e fisiológicos que contribuem para a estabilidade, rigidez e transparência corneais (AXELSSON, 1975; VELASCO, 1988). A condroitina participa dos processos de adesão e migração celulares, orientação axonal e da reparação cicatricial, além de proteger a membrana celular de espécies reativas de oxigênio e de inibir a ação de enzimas líticas (MILEV, 1994; RONCA, 1998; ANDERSON et al., 2000).

A apresentação comercial de colírios enriquecidos com sulfato de condroitina motivou compararem-se os seus efeitos com outros agentes comumente utilizados no tratamento de ulcerações corneais (LEDBETTER et al., 2007). NAKAMURA et al (2004), relataram que o agente não apresentou benefícios quanto a velocidade de epitelização corneal, quando comparado com o ácido hialurônico.

As córneas tratadas com a n-acetilcisteína e o EDTA 1% não apresentaram vantagens, relativamente à taxa de epitelização corneal. Resultados similares foram reportados em cães tratados com N-acetilcisteína 10% e 3%, onde as córneas apresentarem-se epitelizadas em tempo significativamente maior quando comparado com o grupo controle (ALDAVOOD et al., 2003). Pesquisas recentes também demonstraram que a N-acetilcisteína não acelerou a epitelização de úlceras corneais em coelhos quando utilizada isoladamente ou em combinação com dexametasona (SARCHAHI et al., 2008). Na presente pesquisa, optou-se pela N-acetilcisteína 10%, haja vista a literatura não reporta efeitos epiteliotóxicos nessa concentração (BROOKS & OLLIVIER, 2004).

Embora, sem significância estatística, as córneas tratadas com EDTA 1% apresentaram epitelização mais lenta e halos de maior diâmetro, comparativamente aos demais agentes antiproteolíticos testados. O evento pode ser explicado por possível toxicidade em células epiteliais e ceratócitos em divisão. Nessa concentração, o agente mostrou-se epiteliotóxico quando testado *in vitro* (CORBETT et al., 2001). Mesmo assim, optou-se pela concentração a 1%, pois resultados publicados em cães demonstraram que o agente apresentou potente ação antiproteolítica (COUTURE et al., 2006).

Relativamente à quantificação das metaloproteinases, optou-se, na presente pesquisa, pela zimografia em gel, porque se consegue a detecção da forma latente (ou pró-forma) e da forma ativa das metaloproteinases, tomando-se por base o seu peso molecular e processos de denaturação-renaturação no gel (OLLIVIER, 2004). As formas latentes foram analisadas, devido a que embora estas enzimas não tenham bioatividade, elas podem ser ativadas por diferentes fatores (OLLIVIER, 2004).

Formas latentes e ativas da metaloproteinase-2 (MMP-2) foram encontradas em animais saudáveis (basal) e com úlcera corneal. Relativamente à MMP-9 latente, encontrou-se a sua expressão em todos os animais do estudo, exceto nos saudáveis, corroborando com o mostrado por FINI & GIRARD (1990), ao mostrarem que a MMP-2 existe na forma inativa em córneas saudáveis e a sua função é notadamente importante na remodelação da matriz extracelular corneal e nas fases de reparação cicatricial. Outrossim, ao informarem que a síntese de MMP-9 é induzida na dependência de lesões corneais, principalmente nos estágios iniciais da reparação (YE & AZAR, 1988; WONG et al., 2002).

As amostras para a avaliação da atividade das metaloproteinases à zimografia em gel foram tomadas em dois períodos. Na presente pesquisa, a primeira amostra foi tomada às 20 horas e a segunda às 42 horas (tempo máximo de epitelização) do início das lesões. A escolha de tais tempos fora determinada após estudos piloto. Comparações foram feitas entre os dois tempos e entre os tratamentos instaurados: com N-acetilcisteína, com sulfato de condroitina, com solução salina ou com EDTA 1%.

Nenhum dos agentes utilizados foi capaz de reduzir totalmente o quantitativo das metaloproteinases nos períodos avaliados. Reportou-se que a N-acetilcisteína 10% apresentou capacidade antigelatinolítica de até 98%, em estudo *in vitro*, realizado com lágrima de equinos acometidos por ceratomalácia (OLLIVIER et al., 2003). Após a confecção das úlceras, elevação significativa da forma latente da MMP-2 foi observada no grupo tratado com N-acetilcisteína 10%. Todavia, em sua forma ativa, o quantitativo da MMP-2 nas córneas tratadas com N-acetilcisteína 10% não diferiu de forma significativa quando comparada aos controles. Outrossim, níveis significativamente mais elevados de MMP-9 em sua forma latente foram observados às 48 horas. Muitos fatores podem ter influenciado na expressão aumentada das metaloproteinases no grupo tratado com esta substância, como a frequência ou o intervalo entre tratamentos, a sua instabilidade dependente da temperatura (BROOKS, 1999; WARD, 1999), sua pobre penetração no estroma corneal, o incremento considerável dos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos ao considerar que eles sintetizam MMP-9 (PFISTER et al., 1981; FINI & GIRARD, 1990, TWINING, 1994); sua importante ação mucolítica que desestabiliza o filme lacrimal e a provável colonização das úlceras por bactérias, responsáveis pela produção de MMPs (HUGHES, 1986; SLANSKY, 1969; BROWN, 1970; BROOKS & OLLIVIER, 2004).

A similitude da N-acetilcisteína 10%, o sulfato de condroitina 3% também elevou os níveis corneais de MMP-2 latente, 20 e 48 horas após a confecção das úlceras. Contudo, o sulfato de condroitina 3% foi o único agente testado capaz de elevar o quantitativo de MMP-2, em sua forma ativa, às 42 horas. Desconhecem-se publicações prévias relativas ao poder antigelatinolítico do Sulfato de condroitina (glicosaminoglicano monosulfatado) em córneas aviltadas de animais e do homem. Entretanto, o uso local de glicosaminoglicano polissulfatado 5%, não reduziu o quantitativo de MMPs na córnea de cães saudáveis (COUTURE et al., 2006).

A matriz extracelular da córnea é rica em glicosaminoglicanos, notadamente em sulfato de condroitina (MICHELACCI et al., 2003). Admite-se, na presente pesquisa, que o sulfato de condroitina possa ter atuado como substrato para a MMP-2, justificando sua elevação. Resultados similares foram observados por SAKUMA et al.

(2000), que descreveram aumento na expressão gênica de MMP-9 na córnea de coelhos injuriada por álcali, tratadas com hialuronato de sódio. A elevação no quantitativo dessa enzima, não permite concluir, todavia, que o agente apresente propriedades deletérias à córnea, pois mesmo sem significância estatística, as córneas tratadas com sulfato de condroitina se epitelizaram mais rapidamente que as tratadas com os outros agentes. WILLEFORD et al. (1998), reportaram que glicosaminoglicanos polisulfatados apresentam atividade antiproteolítica sobre a plasmina, mas não sobre as MMPs e que a terapia com tais agentes pode ser benéfica em casos de úlceras.

O EDTA 1%, quando comparado com as demais substâncias, apresentou menor expressão da MMP-2 latente exceto às 42 horas, onde se ratifica aumento na expressão desta enzima. A MMP-2 ativa, quando comparada com os valores do grupo controle, mostrou níveis de expressão menores. Tais achados corroboram com aqueles que reconhecem no EDTA um potente inibidor específico de metaloproteinases comumente empregado para tratamento de ceratites ulcerativas (BERMAN, 1980; LI et al., 2001).

Cabe considerar que a reduzida inibição inicial da atividade das MMP-2 ativa e o aumento na sua expressão às 42 horas das ulcerações, podem estar relacionados com a concentração de EDTA empregada (1%), pois os níveis de efetividade desta substância são encontrados à concentrações de 0,2% e o seu potencial tóxico já à concentrações de 0,37% (CORBETT, et al., 2001).

Na lágrima de equinos acometidos por ceratomalácia e na córnea de cães saudáveis, o EDTA inibiu a atividade gelatinolítica, respectivamente, em 99,4% e em 68%. Na presente pesquisa, o EDTA 1% não apresentou inibição de tal significância (OLLIVIER et al., 2003). Estes fatos podem ser apoiados em estudos que afirmam que o quantitativo destas enzimas se eleva do 3º ao 7º dias após abrasões com hidróxido de sódio e que os níveis teciduais se reduzem ao 14º dia (SHI et al., 2010). Os mesmos autores observaram que o nível de tais enzimas gelatinolíticas se elevou em paralelo à neovascularização corneal (SHI et al., 2010). De fato, outro estudo demonstrou que a angiogenese corneal tem início três dias após a queimadura por álcali, atingindo seu pico, duas semanas após o ocorrido (YAN et al., 2009). Dessa forma, admite-se

que períodos mais longos que os adotados no presente estudo pudessem esclarecer o papel desse agente quanto à inibição de MMPs.

A expressão de metaloproteinases no grupo tratado com solução salina mostrou resultados similares aos encontrados em animais tratados com EDTA 1%. A expressão de MMP-2 e MMP-9 foram reduzidas. Estes efeitos favoráveis encontrados no grupo controle ao se comparar com os resultados obtidos com as diferentes substâncias empregadas na nossa pesquisa sugerem benefícios quanto à hidratação corneana pela solução salina fisiológica que pode ter ajudado junto aos glicosaminoglicanos para a manutenção da adequada hidratação deste tecido (CREMONINI, et. al., 2004), pois na nossa pesquisa, o grupo tratado com sulfato de condroitina e o grupo controle mostraram significativa redução no tempo de reepitelização corneal.

Outrossim, os nossos resultados sugerem epiteliotoxicidade das substâncias empregadas na nossa pesquisa, pois mesmo sem preservativos alguns colírios, são epiteliotóxicos como foi mostrado em colírios de antibióticos de amplo espectro (GELATT, 2003), anestésicos (ROSENWASSER et al., 1990; MARCONDES, 1999); AINES (LINN et al., 2000; GUIDERA et al., 2001), inibidores de metaloproteinases como N-Acetilcisteína (WAGONER, 1997) e EDTA a concentrações de 0,37% (CORBETT, et al., 2001).

A utilização de solução salina 0,9% em ulcerações corneais por álcali pode favorecer a limpeza e redução da substância química que ocasiona a lesão, no nosso caso do NaOH 1N. Consideramos que os pacientes tratados com esta substância, apresentaram um tempo de exposição ao álcali menor comparado aos demais grupos e conseqüentemente uma menor expressão de metaloproteinases.

A avaliação por microscopia eletrônica de varredura permitiu verificar às 20 horas das abrasões, que a qualidade das células migrando sobre o estroma acelular foi prejudicada em todos os olhos estudados. Todavia, constatou-se que 48 horas após queimadura por álcali, o fenótipo das células epiteliais de superfície e das microvilosidades corneais já estava reconstituído, notadamente nos olhos tratados com N-acetilcisteína e solução salina.

O homem e outros mamíferos apresentam microvilosidades na superfície do epitélio corneal (COLLIN & COLLIN, 2000). Optou-se por utilizar o método de binarização de imagens, pois outros estudos demonstram que a técnica é factível na quantificação de tais estruturas (RIBEIRO et al., 2010). Não se encontraram, todavia, diferenças significativas entre as substâncias empregadas, comparativamente às córneas normais. Tais dados permitem supor que nenhuma das substâncias testadas ofereceu proteção ao epitélio corneal, 48 horas após as queimaduras com hidróxido de sódio. Outros métodos de avaliação, como marcadores de células apoptóticas poderiam ser benéficos, relativamente ao esclarecimento desse evento.

Os nossos resultados enquanto à reepitelização corneal, expressão de metaloproteinases e microscopia eletrônica de varredura em casos de ceratites ulcerativas, sugerem a necessidade de avaliar a combinação de substâncias como o sulfato de condroitina em associação ao EDTA em concentrações menores ao 1%.

7.0 CONCLUSÕES

1. Considerando-se a maneira como a pesquisa fora concebida e levando-se em conta as injunções do meio onde ela fora realizada, é possível admitir que o uso do sulfato de condroitina auxilia na reepitelização em ceratites ulcerativas.

2. Substâncias como o EDTA 1%, a N-acetilcisteína 10% e Sulfato de condroitina 3%, de forma isolada, não inibiram por completo as MMP-2 e MMP-9, nem mostraram proteção ao epitélio corneal em casos de ceratites ulcerativas induzidas por álcali.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALDAVOOD, S.J.; BEHYAR, R.; SARCAHI, A.A.; RAD, M.A.; NOROOZIAN, I.; GHAMSARI, S.M.; SADEGHI-HASHJIN, G. Effect of acetylcysteine on experimental corneal wounds in dogs. **Ophthalmic Research**, v.35, p.319- 323, 2003.

ANDERSON, J.L.; LEDET, T.; HAGER, H.; JOSEPHSEN, K.; EHLERS, N. The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts. **Experimental Eye Research**, v.71, p.33–34, 2000.

AXELSSON, I.; HEINEGÅRD, D. Fractionation of proteoglycans from bovine corneal stroma. **The Biochemical Journal**, v.145, p.491– 500, 1975.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. 629p.

BARLETTA, J.P.; ANGELLA, G.; BALCH, K.C.; DIMOVA, H.G.; STERN, G.A.; MOSER, M.T.; van SETTEN, G.B.; SCHULTZ, G.S. Inhibition of Pseudomonal ulceration in rabbit corneas by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v.37, n.1, p.20–28, 1996.

BARROS, L.F.M.; BARROS, P.S.M.; ROPKE, C.D.; SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M.; BELFORT, 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, p. 1129-1132, 2007.

BERMAN, M. Collagenase and corneal ulceration. In:_____. **Collagenase in normal and pathological connective tissues**, Woolley, D and Evanson J (Eds), p. 140–174, 1980.

BIRKEDAL, H. From tadpole collagenase to a family of matrix metalloproteinases. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.17, p.445–51, 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BROOKS, D.E. Equine ophthalmology. In: _____ **Veterinary Ophthalmology** 3. ed, Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins, 1999. p. 1053-1116.

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

BROWN, S. Collagenase and corneal ulcers. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v.10, p.203–209, 1971.

BROWN, S.; WELLER, C.; AKIYA, S. Pathogenesis of ulcers of the alkali-burned cornea. **Archives of Ophthalmology**, v.83, n.2, p.205–208, 1970.

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

CARTER, R.T.; KAMBAMPATI, R.; MURPHY, C.J.; BENTLEY, E. Expression of Matrix Metalloproteinase 2 and 9 in experimentally wounded canine corneas and spontaneous chronic corneal epithelial defects cornea. **Cornea**, v.26, n.10, p.1213–1219, 2007.

CHAN, P.S.; CARON, J.P.; ROSA, G.J.; ORTH, M.W. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. **Osteoarthritis Cartilage**, v.13, p.387–394, 2005.

CHANDLER, H.L.; KUSEWITT, D.F.; COLITZ, C.M.H. Enhanced protease production in refractory corneal ulcers. In: **Proceedings of the Association for Research in Vision and Ophthalmology**, Abstracts...2003. p.37.

CLARK, A. New discoveries on the roles of matrix metalloproteinases in ocular cell biology and pathology. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.39, n.13, p.2514–2516, 1998.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E.M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Laboratory animals. In:_____. **Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2**, 1997, v.31, p.1-32.

COLLIN, H. B.; COLLIN, S. P. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. **Cornea**, v.19, n.2, p.218–230, 2000.

CORBETT, M.C.; O'BRART, D.P.; PATMORE, A.L., MARSHALL, J. Effect of collagenase inhibitors on corneal haze after PRK. **Experimental Eye Research**; v.72, n.3, p. 253–259, 2001.

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.

CREMONINI, D. N.; BRANDÃO, C. V. S.; CROCCI, A. J.; MANNARINO, R.; RANZANI, J. J. T.; RODRÍGUEZ, G. N.; ROCHA, N. S. Avaliação do uso tópico de sulfato de condroitina A (Ciprovet) no tratamento de úlcera de córnea experimental em coelhos. **Medvop – Revista de Medicina Veterinária – Pequenos animais e animais de estimação**, v. 2, n. 5, p. 51-56, 2004.

DONZIS, P. B.; MONDINO, P. J. Management of non infectious corneal ulcers. **Survey of Ophthalmology**, v.32, n.2, p.94-110, 1987.

FINI, M.E.; GIRARD, M.T. Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.31, p.1779-1788, 1990.

FINI, M.E.; GIRARD, M.T.; MATSUBARA, M. Collagenolytic/ gelationolytic enzymes in corneal wound healing. **Acta Ophthalmologica Supplementum**, v.202, p.26-33, 1992.

FREITAS, D.; Queimadura ocular. In:_____ **Trauma ocular**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. cap 1. (Biblioteca Brasileira de Oftalmologia), 1997.

GEERLING, G.; JOUSSEN, A.M.; DANIELS, J.T.S.; MULHOLLAND, B.; KHAW, P.T.; DART, J.K. Matrix metalloproteinases in sterile corneal melts. **Annals of the New York Academy of Science**, v.878, p. 571-574, 1999.

GELATT, K.N. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Editora Monole, 2003.

GOPINATHAN, U.; RAMAKRISHNA, T.; WILLCOX, M.; RAO, C.M.; BALASUBRAMANIAN, D.; KULKARNI, A.; VEMUGANTI, G.K.; RAO, G.N. Enzymatic clinical and histologic evaluation of corneal tissues in experimental fungal keratitis in rabbits. **Experimental Eye Research**, v.72, p.433-442, 2001.

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

GROSS, J. **Cell Biology of Extracellular Matrix**. New York, 1981, p.217–258.

GROSS, J., LAPIERE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay.

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.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and co-polymerized substrates. **Analytical Biochemistry**. v.102, p.196-202, 1980.

HIBBETS, K.; HINES, B.; WILLIAMS, D. An overview of protease inhibitors. **Journal of Veterinary International Medicine**, v.13, p.302-308, 1999.

HUGHES, W. F. Alkali burns of the eye. **Archives of Ophthalmology**, v. 35, n. 4, p. 423-449, 1986

KALLBERG, M.E.; BROOKS, D.E.; OLLIVIER, F.J.; NELLIGAN, P.A.; GELATT, K.N. Differences in location of matrix metalloproteinases 2 and 9 in normal and ulcerated canine corneas (Abstract). In **35th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists**, Washington, DC, USA, 2004. Abstract. Washington: American College of Veterinary Ophthalmologists, 2004. p. 437-453.

KATO, T.; NAKAYASU, K.; KANAI, A. Corneal wound healing: immunohistochemical features of extracellular matrix following penetrating keratoplasty in rabbits. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.44, p.334–34, 2000.

KATO, T.; SAIKA, S.; OHNISHI, Y. Effects of the matrix metalloproteinase inhibitor GM6001 on the destruction and alteration of epithelial basement membrane during the healing of post-alkali burn in rabbit cornea. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.50, n.2, p.90-5, 2006.

KENNEY, M.C.; CHWA, M.; ALBA, A.; SAGHIZADEH, M.; HUANG, Z.S.; BROWN, D.J. Localization of TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, gelatinase A and gelatinase B in pathological human corneas. **Current Eye Research**, v.17, p.238–246, 1998.

KENYON, K.; BERMAN, M.; ROSE, J.; GAGE, J. Prevention of stromal ulceration in the alkaliburned rabbit cornea by glued-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.18, n.6, p.570–87, 1979.

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. In: _____ **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. Saunders Company, 1990, p.658-664.

KERNACKI, K.A.; FRIDMAN, R.; HAZLETT, L.D.; LANDE, M.A.; BERK, R.S. *In vivo* characterization of host and bacterial protease expression during *Pseudomonas aeruginosa* corneal infections in naïve and immunized mice. **Current Eye Research**, v.16, p.289-297, 1997.

KESSLER, E.; KENNAH, H.E.; BROWN, S.I. *Pseudomonas* protease. Purification, partial characterization, and its effect on collagen, proteoglycan and rabbit corneas. **Investigative ophthalmology and Visual Sciences**, v.16, p.488-497, 1977.

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.77-87, 2007.

LI, D.Q.; LOKESHWAR, B.L.; SOLOMON, A.; MONROY, D.; JI, Z. PFLUGFELDER, S.C. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v.73, n.4, p.449–459, 2001.

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

MADLENER, M.; PARKS, W.C.; WERNER, S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Experimental Cell Research**. v.242, p.201–10, 1998.

MARCONDES, A.M. Anestésicos tópicos. In____: **Farmacologia & Terapêutica ocular**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1999, p.29-34.

MATSUBARA, M.; GIRARD, M.T.; KUBLIN, C.L.; CINTRON, C.; FINI, M.E. Differential roles for two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family in the remodeling cornea. **Developmental Biology**, v.147, p.425–39, 1991.

MATSUBARA, M.; ZIESKE, J.; FINI, M.E. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.32, n.13, p.3221–3237, 1991.

Mc CULLEY, J.P. Chemical injuries. In:_____ **The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice**, 2nd. ed. Boston: Little, Brown; 1987. p.527-42.

MICHELACCI, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.8, p.1037-1046, 2003.

MILEV, P.; FRIEDLANDER, D.R.; SAKURAI, T.; KARTHIKEYAN, K.; FLAD, M.; MARGOLIS, R.K.; GRUMET, M.; MARGOLIS, R.U. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. **The Journal of Cell Biology**. v.127, p.1703–1715,1994.

MOHAN, R.R.; STAPLETON, W.M.; SINHA, S.; NETTO, M.V.; WILSON, S.E.; A novel method for generating corneal haze in anterior stroma of the mouse eye with the excimer laser. **Experimental Eye Research**, v.86, p.235-240, 2008.

MOSES, M.A.; MARIKOVSKY, M.; HARPER, J.W.; VOGT, P.; ERIKSSON, E.; KLAGSBRUN, M.; LANGER, R. Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.60, p.379–86, 1996.

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.

NAGASE, H.; OKADA, Y. Proteinases and matrix degradation. In:_____. **Text Book of Rheumatology**, 5th ed, 1997, p.323-338.

NAKAMURA, S.; OKADA, S.; UMEDA, Y.; SAITO, F. Development of a rabbit model of tear film instability and evaluation of viscosity of artificial tear preparations. **Cornea**, v.23, p.90–397, 2004.

OH, J.Y.; KIM, M.K.; SHIN, M.S.; LEE, H.J.; KO, J.H.; WEE, W.R.; LEE, J.H. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. **Stem Cells**, v.26, n.4, p.1047-1055, 2008.

OLLIVIER, F. **Matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, connective tissue growth factor in the equine tear fluid**: possible implications in corneal wound healing. **PhD Dissertation**, University of Florida, Gainesville, FL, May 2004.

OLLIVIER, F.J.; BROOKS, D.E.; KALLBERG, M.E.; KOMAROMY, A.M.; LASSALINE, M.E.; ANDREW, S.E., et al. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinase activities in the tear film of horses with ulcerative keratitis. **American Journal Veterinary Research**, v.64, p.1081–7, 2003.

OLLIVIER, F.J.; BROOKS, D.E.; VAN SETTEN, G.B.; SCHULTZ, G.S.; GELLAT, 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.10, n.4, p.199-206, 2007.

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

ORTH, M.W.; PETERS, T.L.; HAWKINS, J.N. Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCL and chondroitin sulfate. **Equine Veterinary Journal**, V.34, p.224-229, 2002.

PATERSON C, WELLS JG, KOKLITIS PA, HIGGS GA, DOCHERTY AJ. Recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 suppress alkali-burn-induced corneal

ulceration in rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.35, p.677–84, 1994.

PETROUTSOS G, GUIMARAES R, GIRAUD JP, RENARD G, POULIQUEN Y. Effect of acetylcysteine (Mucomyst) on epithelial wound healing. **Ophthalmic Research**, v.14, p.241–8, 1982.

PFISTER, R.R.; NICOLARO, M.L.; PATERSON, C.A. Sodium citrate reduces the incidence of corneal ulcerations and perforations in extreme alkali-burned eyes- acetylcysteine and ascorbate have no favorable effect. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.21, n.3, p.486-90, 1981.

PFISTER, R.R.; HADDOX, J.L.; DODSON RW, DESHAZO WF. Polymorphonuclear leukocytic inhibition by citrate, other metal chelators, and trifluoperazine. Evidence to support calcium binding protein involvement. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.25, p.955-70, 1984.

PRAUSE, J.U. Serum albumin, serum antiproteases and polymorphonuclear leucocyte neutral collagenolytic protease in the tear fluid of patients with corneal ulcers. **Acta ophthalmologica**, v.61, p.272-282, 1983.

REBHUM, W.C. Bacterial ulcers of the equine cornea. **Equine Practice**, v.3, p.40-49, 1981.

RIBEIRO, A.P.; CONCEIÇÃO, L.F.; SILVA, M.L.; PADUA, I.R.M.; ANDRADE, A.L.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LAUS, J.L. EFEITOS DO CETOROLACO A 0,5% SEM PRESERVATIVO APÓS ABRASÃO QUÍMICA COM ÁLCALI EM COELHOS. In: Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. **Anais...**Búzios-Rio de Janeiro, Jornal Brasileiro de Ciência Animal, v.3, n.6, suplemento, 2010.

RONCA, F.; PALMIERI, L.; PANICUCCI, P. ; RONCA, G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.6 (Supl. A), p.14–21, 1998.

ROSENWASSER, G.O.D.; HOLLAND, S.; PFLUGFELDER, S.C. Topical anesthetic abuse. **Ophthalmology**, v.97, p.967-72,1990.

SAIKA, S.; MIYAMOTO, T.; YAMANAKA, O.; KATO, T.; OHNISHI, Y.; FLANDERS, K.C.; IKEDA, K.; NAKAJIMA, Y.; KAO, W.W.Y.; SATO, M.; MURAGAKI Y.; OOSHIMA, A.; Therapeutic Effect of Topical Administration of SN50, an Inhibitor of Nuclear Factor- κ B, in Treatment of Corneal Alkali Burns in Mice. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 5, 2005.

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.

SAKUMA, M.; MIYACHI, S.; SAKAMOTO, T. The effect of sodium hyaluronate on the expression of gelatinases in Rabbit Corneal Epithelial Wound Healing. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v.44, n.5, p.475-481, 2000.

SARCHAHI, A.A.; MAIMANDI, A.; KHODAKARAM, T.A.; AMANI, M. Effects of acetylcysteine and dexamethasone on experimental corneal wounds in rabbits. **Ophthalmic Research**, v.40, n.1, 2008.

SCHLUETER, A.E.; ORTH, M.W. Further studies on the ability of glucosamine and chondroitin sulphate to regulate catabolic mediators in vitro. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.634-636, 2004.

SHI, W.; LIU, J.; LI, M.; GAO, H.; WANG, T. Expression of MMP, HPSE, and FAP in Stroma Promoted Corneal Neovascularization Induced by Different Etiological Factors. **Current Eye Research**, v.35, n.11, p. 967-977, 2010.

SIVAK, J.M.; FINI, E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.21, p.1-12, 2002.

SLANSKY, H.H.; GNADINGER, M.C.; ITOI, M.; DOHLMAN, C.H. Collagenase in corneal ulcers. **Archives of Ophthalmology**, v.82, p.108–11, 1969.

SLATTER, D. Córnea and sclera. In:_____. **Fundamentals of veterinary ophthalmology** 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990, p.179-207.

SORIANO, E.S.; CAMPOS, M.S.; AGUIAR, J.A.; MICHELACCI, Y.M. Effect of epithelial debridement on human cornea proteoglycans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.3, p.325-331, 2001.

STERN, N.E.; GAO, J.; BEUERMAN, R.W. et al. Effects of fourth-generation fluorquinolones on the ocular surface, epithelium, and wound healing. **Cornea**, v.25, n.9, S12-S24, 2006.

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, 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.

TALIERI, I. C.; BUQUERA, L.E.C.; VICENTI, F.M.; JORGE, A.T.; CAMPOS, C.F.; LAUS, J.L. Estudo clínico dos efeitos cicatrizantes de uma solução tópica a 5% de artroglycan e lacrima em úlceras por álcali na córnea de coelhos albinos de laboratório. In XXI Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. Rio de Janeiro: **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. Niterói – RJ, v.07, p.194-194, 2000.

TWINING, S.S. Regulation of proteolytic activity in tissues. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.29 n.5, p. 315–383, 1994.

VELASCO, A.; HIDALGO, J. Ultrastructural demonstration of proteoglycans in adult rat cornea. **Tissue and Cell**, v.20, p.567–575, 1988.

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

WAGONER, M. D. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. **Survey of Ophthalmology**, v.4, n.4, p.275-313, 1997.

WARD D. Ocular pharmacology. In:_____ **Veterinary ophthalmology**. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Gelatt KN, editor, 1999, p.336–54.

WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell**, v.91, n.4, p.439–442, 1997.

WILLEFORD, K.O.; MILLER, W.W.; ABRAMS, K.L.; VAUGHN, B.M. Modulation of proteolytic activity associated with persistent corneal ulcers in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.1, n.1, p.5-8, 1998.

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

WOESSNER, J.F. The matrix metalloproteinase family. In:_____. **Academic Press**, Parks, W.C., Mecham, R.P. (Eds.). San Diego, 1998, p.1–13.

WOESSNER, F.J. MMP Inhibition. **New York Academy of Sciences**, v.878, p.388-403,1999.

WONG TTL, SETHI C, DANIELS JT, LIMB GA, MURPHY G, KHAW PT. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. **Survey of Ophthalmology**, v.47, n.3, p.239–56, 2002.

YANG, Y.N.; BAUER, D.; WASMUTH, S.; STEUHL, K.P.; HEILIGENHAUS, A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and 9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1 and 2) during the course of experimental necrotizing herpetic keratitis. **Experimental Eye Research**, v.77, p.227–237, 2003.

YANG, C.L.; CHEN, H.W.; WANG, T.C.; WANG, Y.J. A novel fibrin gel derived from hyaluronic acid-grafted fibrinogen. **Biomedical Materials**, v.6, n. 2, p.1-11, 2011.

YANG, L.; WANG, Y.; ZHOU, Q.; CHEN, P.; WANG, Y.; WANG, YE.; LIU, T.; XIE, L. Inhibitory effects of polysaccharide extract from **Spirulina platensis** on corneal neovascularization. **Molecular Vision**, v.15, p.1951-1961, 2009.

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

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