

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**REPERCUSSÕES NO EPITÉLIO CORNEANO E SISTÊMICAS DO USO TÓPICO
OCULAR DE CETOROLACO DE TROMETAMINA E DICLOFENACO SÓDICO
EM COELHOS DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA**

FABIANA QUARTIERO PEREIRA

PORTO ALEGRE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Repercussões no epitélio corneano e sistêmicas do uso tópico ocular de ceterolaco de trometamina e diclofenaco sódico em coelhos da raça Nova Zelândia

Autora: Fabiana Quartiero Pereira

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Ciências Veterinárias, na área de concentração de Cirurgia e Toxicologia Veterinária, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. João Antônio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Fabiana Quartiero

Repercussões no epitélio corneano e sistêmicas do uso tópico ocular de cetorolaco de trometamina e diclofenaco sódico em coelhos da raça Nova Zelândia / Fabiana Quartiero Pereira. -- 2016.

91 f.

Orientador: João Roberto de Braga Mello.

Coorientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. AINES. 2. Colírios. 3. Efeitos adversos. 4. Córnea. 5. Coelhos. I. Mello, João Roberto de Braga, orient. II. Pigatto, João Antonio Tadeu, coorient. III. Título.

Fabiana Quartiero Pereira

Repercussões no epitélio corneano e sistêmicas do uso tópico ocular de ceterolaco de trometamina e diclofenaco sódico em coelhos da raça Nova Zelândia

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Ciências Veterinárias

Aprovada em:

Aprovada por:

João Roberto Braga de Mello, Dr., UFRGS
Orientador e Presidente da Comissão

Ana Cristina Borba da Cunha, Dra., UFCSPA

Silvana Górnaiak, Dra., USP

Sérgio Kwitko, Dr., UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Lourival e Sílvia, que sempre me deram suporte material e emocional para que eu pudesse continuar estudando. Agradeço o incentivo, o apoio e o carinho. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês! Mãe, obrigada por cuidar do Gabriel sempre que precisei me ausentar! Pai, obrigada por ter ido comigo até o biotério limpar gaiolas em pleno domingo!

À melhor surpresa que a vida me deu quatro meses antes da qualificação do doutorado: meu filho Gabriel! Todas as dificuldades que enfrentei ao conciliar estudo, experimento, estágio docente, trabalho e maternidade foram pequenas frente à alegria de ter você ao meu lado, sempre sorrindo e cheio de saúde! Meu amor, você me ensinou o que é felicidade.

Ao meu orientador, o professor Dr. João Roberto Braga de Mello, pela oportunidade de ser sua orientada e pela confiança depositada em mim desde o princípio, me deixando livre para escolher e estruturar o projeto de pesquisa. Obrigada por estar sempre disposto a ajudar e pelos “puxões de orelha” nos momentos certos!

À professora Dra. Fernanda Bastos de Mello, por estar sempre ao meu lado, me orientando sobre os rumos da pesquisa, aconselhando, corrigindo, buscando soluções para os problemas e fazendo contatos com pessoas que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

Ao professor Dr. João Antonio Tadeu Pigatto, pela co-orientação nesta tese, por ter me ensinado oftalmologia veterinária e por ter aberto muitas portas para mim há mais de oito anos!

Ao professor Dr. Sérgio Kwitko, por ter participado da banca de qualificação e ter contribuído enormemente para a melhoria do projeto inicial.

Às professoras Dra. Ana Cristina Borba da Cunha e Dra. Marla N. Godoi Biajoli por terem aberto as portas dos seus laboratório na UFCSPA para que as análises químicas fossem possíveis. Professora Ana, obrigada pelo empenho em conseguir o material necessário e pela disponibilidade e paciência em explicar e corrigir a metodologia bioanalítica.

À Priscila Ramires da Silva, aluna da professora Ana Cristina Borba da Cunha.

Obrigada pela dedicação em encontrar a metodologia que melhor se adequasse à nossa realidade para a realização das análises químicas.

Ao professor Davi Driemeier, e toda sua equipe, por ter emprestado o laboratório de patologia veterinária da UFRGS para a manipulação da solução de Karnovsky e por ter gentilmente fornecido as necropsias e sanado muitas dúvidas.

À professora Stella de Faria Valle, por ter possibilitado a realização de mais de 400 análises sanguíneas no LACVET.

À médica veterinária Mariana Olinto Dreyer da Silva, residente do LACVET-HCV, por ter realizado as análises sanguíneas e ter auxiliado nas coletas iniciais.

Ao médico veterinário Eduardo Almeida Ruivo dos Santos, residente do HCV em clínica e cirurgia de animais silvestres, por ter auxiliado nas coletas iniciais e ter me ensinado a “arte” de coletar sangue em coelhos.

Um agradecimento especial às meninas que responderam “sim” ao convite mais desanimador que alguém pode fazer. Um convite para trabalhar em feriados, finais de semana e férias; para tratar animais por 90 dias (que viraram 180 dias, pois o experimento foi realizado em duas etapas) três vezes ao dia, mensurando consumo de água, de ração, instilando colírios e limpando gaiolas... Meu agradecimento especial às estagiárias: Bruna Santos (agora Médica Veterinária), Melina Bender e Tanise Carboni! Sem o comprometimento, o profissionalismo e o caráter de vocês o experimento não teria gerado dados fidedignos! MUITO OBRIGADA!

Às minhas colegas de pós-graduação e amigas: Cláudia Faganello, Maria Cristina Andrade e Paula Hunning. Principalmente à Cláudia e à Paula: sem palavras para agradecer a disponibilidade de tempo para me ajudar na preparação das córneas para a microscopia eletrônica de varredura. Gurias, obrigada pela parceria, troca de conhecimentos e amizade há tantos anos!

Às minhas amigas queridas, Ana Paula, Juliana, Lanucha e Márcia: obrigada por todo apoio psicológico, incentivo, paciência e por estarem sempre presentes na minha vida!

À “vovó” Joeci, por ter adotado o Gabi como neto e estar sempre disposta a me ajudar, além de ter sido a primeira pessoa a confiar no meu trabalho e a me indicar como oftalmologista veterinária!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos que financiou este projeto.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias e à Faculdade de Veterinária e seus funcionários, pela utilização do biotério e pelo auxílio na manutenção do mesmo.

A todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas torceram pelo sucesso desta pesquisa e me ajudaram mesmo que de forma indireta.

Aos animais que são criados com o único objetivo de auxiliar na evolução da ciência, em especial às coelhas utilizadas nesta pesquisa, agradeço e peço perdão. Perdão por ainda não sermos capazes de reproduzir métodos *in vitro* que mimetizem os mecanismos de transporte ativo dos fármacos.

E por fim, obrigada meu Deus. Obrigada pelo conforto e coragem que sempre encontrei nas suas palavras nos momentos mais difíceis; pelas oportunidades e pelas pessoas maravilhosas que sempre apareceram na minha vida. Obrigada também por ter colocado no meu caminho pessoas difíceis de conviver... Elas me fizeram um ser humano mais tolerante, piedoso e forte.

“Só é teimosia se estiver errado, se estiver certo é seguir os seus princípios.”

Dr. House

*Dedico este trabalho
aos meu pais: Lourival e Sílvia.*

Repercussões no epitélio corneano e sistêmicas do uso tópico ocular de ceterolaco de trometamina e diclofenaco sódico em coelhos da raça Nova Zelândia

Autora: Fabiana Quartiero Pereira

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. João Antônio Tadeu Pigatto

RESUMO

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) de uso tópico ocular são amplamente utilizados por um número crescente de médicos e veterinários, clínicos gerais e oftalmologistas. A crescente utilização de AINEs tópicos é motivada pela busca de fármacos que não apresentem os conhecidos efeitos adversos tópicos e sistêmicos dos corticosteróides. Desta forma, os profissionais envolvidos no cuidado destes pacientes devem estar cientes de que fármacos AINEs tópicos não são livres de efeitos adversos. Este trabalho objetivou investigar os potenciais efeitos adversos locais e sistêmicos da utilização de colírios contendo diclofenaco sódico 0,1% e ceterolaco de trometamina 0,5% em coelhos tratados por 90 dias. Desta forma buscou-se elucidar questões relacionadas à segurança do seu uso como agente terapêutico, que poderiam restringir a sua aplicação clínica em pequenos animais. Para isso, 18 coelhos foram divididos em três grupos. Os animais foram tratados três vezes ao dia por 90 dias com colírio de ceterolaco de trometamina 0,5%, diclofenaco sódico 0,1% e solução fisiológica (NaCl 0,9%). Foi realizada a mensuração diária do consumo de água e ração, assim como exames clínicos semanais e coleta de sangue a cada 30 dias. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e necropsiados. A superfície da córnea foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Não houve alterações clínicas e diferenças entre os grupos quanto aos valores de hemograma, leucograma, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e tromboplastina, proteínas totais, albumina, creatinina, sódio e potássio. Dados de necropsia não apontaram alterações macro ou microscópicas no sistema gástrico, hepático e renal. Após noventa dias de tratamento com ambos os colírios contendo AINEs, pôde ser identificado os princípios ativos no plasma por extração em fase sólida e detecção por espectrometria de massas. Valendo-se da MEV foi comprovado que ambos os AINEs causaram alterações no padrão celular do epitélio corneano. Os resultados desta tese foram apresentados no formato de artigos, sendo que no primeiro artigo foram descritas as implicações da absorção sistêmica dos colírios contendo ceterolaco de trometamina 0,5% e de diclofenaco sódico 0,1%; e o segundo artigo referiu-se à avaliação ultraestrutural do epitélio corneano de coelhos tratados por 90 dias com os colírios de sem cons ceterolaco de trometamina 0,5% e de diclofenaco sódico 0,1% sem conservantes.

Palavras-chave: AINES. Colírios. Efeitos adversos. Coelhos.

Systemic effects and in corneal epithelium of topical ketorolac tromethamine and diclofenac sodium in New Zealand white rabbits

Author: Fabiana Quartiero Pereira
Supervisor: João Roberto Braga de Mello
Co-supervisor: João Antonio Tadeu Pigatto

ABSTRACT

The use of topical ophthalmic nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is widely adopted by an increasing number of physicians and veterinarians, general practitioners and ophthalmologists. The increasing use of topical NSAIDs is motivated by the need of administer drugs that do not present the well-known adverse effects of topical and systemic corticosteroids. Thus, the professionals involved in the care of these patients should be aware that topical NSAIDs drugs are not free of adverse effects. This study aimed to investigate the potential local and systemic adverse effects of eye drops administration containing diclofenac sodium 0.1% and ketorolac tromethamine 0.5% in rabbits treated during a period of 90 days. In this manner we sought to clarify issues related to the safety of their use as a therapeutic agent, which could restrict its clinical application in small animals. The 18 rabbits were separated into three groups. The animals were treated three times daily during a period of 90 days with ketorolac tromethamine 0.5% eye drop, sodium diclofenac and 0.1% saline (0.9% NaCl). It was carried out a daily measurement of water and food consumption as well as a weekly clinical examination and blood sampling every 30 days. At the end of the treatment the animals were euthanized and necropsied. The corneal surface was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). There were no clinical alterations and differences between the three groups in terms of blood count values, white blood cell count, platelet count, prothrombin time and thromboplastin, total protein, albumin, creatinine, sodium and potassium. Necropsy data showed no macroscopic or microscopic changes in gastric, hepatic and renal system. Ninety days after treatment with both eye drops containing NSAIDs, it could be identified the active ingredients in the plasma by solid phase extraction and detection by mass spectrometry. Taking advantage of SEM has been proven that both NSAIDs caused changes in cellular pattern of the corneal epithelium. The results from the thesis were presented in these two articles, in the first, we described the implications of the systemic absorption of eyedrops diclofenac sodium 0,1% and ketorolac tromethamine 0,5%; and in the second article which refers to the ultrastructural evaluation of the corneal epithelium of rabbits treated for 90 days with eyedrops diclofenac sodium 0,1% and ketorolac tromethamine 0,5% preservative-free.

Key words: NSAIDs. Ophthalmic solutions. Adverse effects. Rabbits.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Imagem evidenciando a abertura do ponto lacrimal de um coelho sendo canulada.....	29
Figura 2 –	Representação esquemática do sistema nasolacrimal do coelho. O sistema do canal lacrimal é composto pelos canalículos lacrimais (Lc), saco lacrimal (Ls), ducto nasolacrimal (Ld), e o meato nasal (n). Há duas curvas acentuadas, a curva próxima ao osso maxilar (pb) e a curva próxima ao dente incisivo (ib).....	29
Figura 3 –	Córnea hígida de um coelho Nova Zelândia (A1). Corte histológico das camadas da córnea hígida de um coelho (A2). Epitélio (a), membrana basal (b), estroma (c), membrana de Descemet(d),endotélio(e).....	30
Figura 4 –	Avaliação ultraestrutural do epitélio corneano hígido de um coelho, com células hexagonais claras (C), escuras (E) e cinzas ou intermediárias (I). Presença de criptas (setas). Microscópio eletrônico de varredura 1110x.....	31
Figura 5 –	Exemplo de possíveis alterações no epitélio corneano de coelhos observadas através de microscopia eletrônica de varredura. A : aumento do número de criptas (seta). B : Aumento do número de células escuras.....	32
Figura 6 –	Linha de tempo demonstrando os procedimentos que foram realizados nos primeiros sete dias de acompanhamento dos animais.....	36
Figura 7 –	Biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa® SL-15) em um coelho da raça Nova Zelândia.....	39
Figura 1 – (Artigo 1)	Gráfico dos perfis médios e respectivos desvios padrões do peso dos animais segundo os grupos. Os animais tiveram um ganho linear de peso independente do grupo	55
Figura 1 – (Artigo 2)	Exemplo de eletromicrografia da zona central do epitélio da córnea de coelho utilizada para realização da contagem celular e da avaliação do grau de perda do formato hexagonal. Amostra caracterizada como escore III de perda de formato hexagonal, com 18 células claras (b), 22 células cinzas (g) e 30 células escuras (b). Seta vermelha: célula cinza em perfeito formato hexagonal. Setas brancas: células apresentando perda do formato hexagonal.....	66
Figura 2 – (Artigo 2)	Epitélio corneano hígido de coelho (GC). Figura 2A: Célula escura em perfeito formato hexagonal (seta vermelha) e presença de criptas (seta branca). Figura 2B: Observa-se células claras (b), cinzas (g), além de pequeno número de células escuras (d)	68

- Figura 3 – Epitélio corneano de coelho do grupo Diclofenaco. Figura 3A: Célula escura com perda grau 3 do formato hexagonal (seta vermelha) e presença de criptas (seta branca). Figura 3B: (Artigo 2) Observa-se que há aumento do número de células cinzas(g) e escuras(d) e diminuição do número de células claras(b) em comparação com o grupo Controle..... 70
- Figura 4 – Epitélio corneano de coelho do grupo ceterolaco. **Figura 4A:** Célula escura com perda grau 4 do formato hexagonal (seta vermelha) e presença de criptas (seta branca). **Figura 4B:** (Artigo 2) Observa-se que há aumento do número de células cinzas (g) e escuras (d) e diminuição do número de células claras (b) em comparação com o grupo Controle 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Exemplo de medicamentos tópicos oculares e seus efeitos adversos sistêmicos em humanos.....	17
Tabela 2 –	Fármacos AINEs sistêmicos usualmente prescritos para cães, gatos e cavalos.....	20
Tabela 3 –	Grupos experimentais e períodos de tratamento.....	35
Tabela 4 –	Grau de severidade dos procedimentos que foram realizados nos coelhos no presente projeto conforme o Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos (CEUA/UFRGS).....	37
Tabela 5 –	Forma de avaliação dos parâmetros qualitativos da avaliação clínica e oftalmológica semanal.....	38
Tabela 6 –	Grupos experimentais e protocolo de tratamento clínico.....	39
Tabela 1 – (Artigo 1)	Presença dos íons no plasma detectados por SPE/MS que comprovam a absorção sistêmica dos fármacos de acordo com o tempo de tratamento	52
Tabela 2 – (Artigo 1)	Descrição do consumo de água e ração e do peso dos animais segundo os grupos e momentos de avaliação. Ganho de peso dos animais segundo os grupos e resultado das análises comparativas.....	54
Tabela 1 – (Artigo 2)	Descrição da contagem celular e do grau de perda do formato hexagonal, segundo os grupos e comparações entre os grupos	65

SUMÁRIO

CAPITULO I

1	INTRODUÇÃO	14
----------	-------------------------	----

CAPITULO II

2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Anti-inflamatórios não esteroidais	19
2.2.1	Cetorolaco de trometamina.....	24
2.2.2	Diclofenaco sódico.....	26
2.2	Anatomia da superfície ocular e do sistema de drenagem nasolacrimal do coelho	28
2.3	Análise ultraestrutural do epitélio da córnea	30
2.4	Técnica analítica - extração em fase sólida e espectrometria de massas	33

CAPÍTULO III

3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Cálculo do número amostral	35
3.2	Animais experimentais	35
3.3	Princípios éticos da pesquisa	36
3.4	Exame clínico	37
3.4.1	Exame clínico geral.....	37
3.4.2	Exame clínico oftalmológico.....	37
3.5	Protocolo de Tratamento Clínico	39
3.5.1	Mensuração do Consumo de água e ração.....	39
3.6	Coleta de sangue	40
3.7	Análises laboratoriais	40
3.7.1	Método Bioanalítico – SPE/MS.....	41
3.8	Eutanásia dos animais experimentais	42
3.9	Obtenção e preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43
3.10	Necrópsia e histopatologia	44
3.11	Descarte de resíduos químicos ebiológicos	44
3.12	Análise estatística	45

CAPITULO IV

	Avaliação das repercussões sistêmicas do uso tópico ocular de cetorolaco de trometamina e diclofenaco sódico em coelhos da raça Nova Zelândia	45
--	--	----

CAPITULO V

	Avaliação ultraestrutural do epitélio corneanos de coelhos tratados por 90 dias com colírios de cetorolaco de trometamina diclofenaco sódico sem conservantes	62
CONCLUSÕES		76
REFERÊNCIAS		77

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) de uso tópico ocular são amplamente utilizados por um número crescente de médicos e veterinários, clínicos gerais e oftalmologistas. A crescente utilização de AINEs tópicos é motivada pela busca de fármacos que não apresentem os conhecidos efeitos adversos tópicos e sistêmicos dos corticosteróides (SCHALNUS, 2003; GIULIANO, 2004; IRIT, 2011). Desta forma, os profissionais envolvidos no cuidado destes pacientes devem estar cientes de que fármacos AINEs tópicos não são livres de efeitos adversos, a fim de minimizar a probabilidade de complicações (GAYNES; FISCELLA, 2002; GIULIANO, 2004, WOODWARD, 2009). É, portanto, do interesse da comunidade médica veterinária a conscientização sobre os perigos potenciais intrínsecos do uso oftalmológico prolongado dos AINEs, tendo em vista que novos medicamentos deste grupo, de uso tópico ocular, estão sendo gradativamente introduzidos na terapêutica oftálmica veterinária, apesar do pouco conhecimento a respeito da farmacocinética destes AINEs nas diversas espécies animais (GIULIANO, 2004, WOODWARD, 2009).

É, portanto, do interesse da comunidade médica veterinária a conscientização sobre os perigos potenciais intrínsecos do uso oftalmológico prolongado dos AINEs, tendo em vista que novos medicamentos deste grupo, de uso tópico ocular são utilizados para o tratamento oftálmico em diversas espécies animais apesar do pouco conhecimento a respeito da farmacocinética destes AINEs em cada espécie.

Os AINEs são uma das classes de medicamentos mais utilizadas em todo o mundo. São indicados para humanos e animais com o propósito de alívio sintomático de condições dolorosas e inflamatórias agudas ou crônicas (JERICÓ; ANDRADE, 2008). A inibição das enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) promove uma ação anti-inflamatória e analgésica (ARAGONA, et al 2000; JERICÓ; ANDRADE, 2008; TASAKA, 2011). O tipo de AINE, a seletividade COX-1/COX-2, a meia vida de eliminação e o tempo de tratamento são os principais fatores que desencadeiam efeitos adversos em humanos e animais (JERICÓ; ANDRADE, 2008). Os conhecimentos da farmacocinética e farmacodinâmica, em especial

dos anti-inflamatórios, são de suma importância, pois a meia-vida de uma mesma substância difere muito entre as espécies animais em que são empregadas (TASAKA, 2011).

Em animais, os efeitos adversos do uso sistêmico de alguns AINEs são bem documentados: distúrbios gastrointestinais, discrasias sanguíneas; hipoproteinemia; broncoconstrição; hepatopatia; nefrotoxicidade e anormalidades fetais (GIULIANO, 2004, JERICÓ; ANDRADE, 2008; TASAKA, 2011). Vários fatores devem ser levados em consideração durante a utilização de anti-inflamatórios, como nefropatias, hepatopatias e a idade do paciente, onde, animais muito jovens apresentam o sistema enzimático hepático imaturo e os idosos não possuem a mesma eficiência renal e hepática (TASAKA, 2011). Frente à diversidade de AINEs disponíveis no mercado, poucos são os aprovados para o uso em animais, pois faltam estudos em longo prazo para determinar segurança, eficácia e doses apropriadas para cada espécie. Após aprovado um fármaco para uso veterinário e a dose estabelecida para cães, normalmente faz-se uma extrapolação, com ajuste da dose recomendada para outras espécies, principalmente felinos. Esta prática pode resultar em reações adversas e intoxicações (BOOTHE, 1990; MACY, 1994, SPARKES et al., 2010). A mesma extrapolação de indicação terapêutica ocorre com o uso de colírios contendo AINEs aprovados para o uso em humanos. Vários AINEs tópicos estão atualmente aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA): o diclofenaco, o ceterolaco, o flurbiprofeno, o suprofenico, o bromfenaco, o nepafenaco e a indometacina. Sendo este último disponível somente no Canadá e na Europa (ZANETTI et al., 2012, HSU, 2013). Destes AINEs, os mais utilizados em oftalmologia veterinária são o diclofenaco, o ceterolaco e o flurbiprofeno (GIULIANO, 2004; HSU, 2013).

Em oftalmologia veterinária, anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais são muito utilizados por via tópica ocular para tratamento da inflamação e controle da dor, em uveítes, ceratoconjuntivites e como adjuvantes no controle da inflamação de glaucomas secundários (GELATT, 2000a; GELATT, 2000b; GIULIANO, 2004; TOWNSEND, 2008; MARTINS et al; 2009). Alguns pacientes, principalmente os felinos, que apresentam uveítes crônicas e ceratoconjuntivites proliferativas, necessitam de tratamento prolongado e até manutenção *ad eternum*. (MORGAN et al., 1996; GELATT, 2000b). Ao contrário do que ocorre com o uso prolongado de anti-inflamatórios esteroides tópicos, os AINEs tópicos geralmente são bem tolerados, com baixa incidência de efeitos adversos em tratamentos por longo prazo em

humanos (GAYNES; FISCELLA, 2002). Entretanto, apesar da baixa incidência, efeitos adversos locais importantes foram reportados com o uso de AINEs, como: diminuição da sensibilidade corneal (SUN; GIMBEL; 1996), defeitos epiteliais persistentes e ceratite punctata superficial (GILLS, 1994; SHIMAZAKI et al., 1995), infiltrados estromais (SHER, et al 1993) e infiltrados subepiteliais (PROBST; MACHAT, 1996), ulceração do estroma corneal (LIN et al; 2000), destruição do colágeno da córnea (ASAI et al., 2006; ESTEROIDEOS, 2009) e perfuração da córnea (GUIDERA et al., 2001; DEMIREL, SARAC, 2012). Medicamentos na forma de colírio se concentram em grande parte na córnea e na conjuntiva, sendo as células epiteliais corneais mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos cumulativos dos medicamentos (BURSTEIN, 1980).

Diversos estudos comprovam que fármacos administrados por via tópica ocular podem apresentar efeitos adversos locais ou sistêmicos (MARKMAN et al., 1964; POLANSKY , 1992; SHARIR, 1997; FLACH, 2001; GAYNES; FISCELLA, 2002; TRIPATHI et al., 2003; FRAUNFELDER, 2006; ANDRADE, 2008; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010; BAHAR et al., 2011). O principal mecanismo de absorção sistêmica de fármacos de uso tópico ocular ocorre pelo sistema de drenagem das vias lacrimais, que tem o seu óstio de abertura no meato inferior da cavidade nasal. Por este trajeto, medicamentos na forma de colírio, gel ou pomada, podem ser absorvidos pela circulação sistêmica através da mucosa nasal e provocar efeitos adversos. A ocorrência ou não destes efeitos dependerá da farmacocinética do medicamento (volume de distribuição, concentração e quantidade administrada) e da sensibilidade individual do organismo àquele medicamento (LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010). Por esse motivo, atenção especial deve ser dada a pacientes em extremos de idade, principalmente crianças, por apresentarem maior sensibilidade e menor volume sanguíneo, podendo a medicação levar a efeitos adversos graves (Tabela 1), inclusive a morte (ISENBERG; EVERETT, 1984; BOWMAN et al., 2004;LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010).

Tabela 1: Exemplo de medicamentos tópicos oculares e seus efeitos adversos sistêmicos em humanos.

Medicação tópica ocular	Indicação oftalmológica	Efeitos sistêmicos mais comuns
Beta-bloqueadores (timolol)	Antiglaucomatoso	Broncoconstrição, bloqueios atrioventriculares, bradicardia
Alfa agonistas (tartarato de brimonidina)	Antiglaucomatoso	Sonolência, Insuficiência coronariana ou cerebral
Agonistas colinérgicos (pilocarpina)	Antiglaucomatoso	Sialorréia, gastrite, broncoconstrição
Análogos de prostaglandina	Antiglaucomatoso	Trabalho de parto precoce, broncoconstrição
Ciclopentolato/Fenilefrina/Atropina	Midríase farmacológica	Alucinações, euforia, taquicardia
Vasoconstritores tópicos	Descongestionante ocular	Hipertermia, arritmia, euforia, rubor facial
Corticóides	Anti-inflamatório	Hipercortisolismo
AINEs	Anti-inflamatório	Bronqu Coastrição

Fonte: ISENBERG; EVERETT, 1984; SITENGA et al., 1996; SHARIR, 1997; BOWMAN et al., 2004; LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010.

Alguns indivíduos, tanto humanos quanto animais, apresentam reações exacerbadas, reduzidas, ou mesmo diferentes da esperada a determinados medicamentos (FLÓRIO, 2011). Na medicina veterinária, Identificar as susceptibilidades de cada espécie aos fármacos é um desafio, devido às particularidades inter e intra espécies, como diferenças anatômicas, fisiológicas, genéticas e até mesmos comportamentais (TOUTAIN et al., 2010; FLÓRIO, 2011; TASAKA, 2011). Na área da oftalmologia, o coelho é considerado o principal modelo experimental, devido às semelhanças anatômicas com a córnea de humanos (DOUGTH, 1990) e de outras espécies animais como cães, gatos, ratos e macacos (PFISTER, 1973; BARROS, 1997). O coelho também já foi utilizado em diversos estudos de absorção sistêmica de fármacos de uso tópico ocular (TANG-LIU et al., 1984; FOETS, et al., 1985; CHANG; LEE, 1987; PLEYER, et al. 1993; URTTI; SALMINEN, 1993; SIGURDSSON, et al. 2007; NOMOTO, et al., 2009; PROKSCH, et al. 2009; LI et al., 2013).

Tendo em vista que até o presente momento não foram encontrados estudos avaliando efeitos adversos locais e sistêmicos de uso tópico ocular de AINE a médio e longo prazo em pequenos animais, objetivou-se avaliar em coelhos da raça Nova Zelândia possíveis efeitos adversos locais e sistêmicos do uso tópico ocular em médio prazo de colírios anti-inflamatórios não esteroidais – diclofenaco sódico 0,1% (DS) e cetorolaco de trometamina 0,5% (CT).

Desta maneira, esta tese teve por objetivos:

Objetivo Geral:

Investigar os potenciais efeitos adversos locais e sistêmicos, em médio prazo, da utilização de colírios contendo DS e CT, manipulados sem conservantes. Desta forma buscou-se elucidar questões relacionadas à segurança do seu uso como agente terapêutico, que poderiam restringir a sua aplicação clínica em pequenos animais.

Objetivos Específicos:

- a) Avaliar e comparar, através de microscopia eletrônica de varredura, as possíveis alterações no epitélio da córnea de coelhos hípidos da raça Nova Zelândia tratados por 90 dias com DS e CT manipulados sem conservantes.
- b) Comprovar a absorção sistêmica dos colírios identificando a presença dos fármacos no plasma através de extração em fase sólida e espectrometria de massas das amostras sanguíneas em 30, 60 e 90 dias. Relacionar com os achados laboratoriais e clínicos buscando possíveis efeitos adversos de acordo com o tempo de tratamento.
- c) Comparar com o grupo controle, os possíveis achados *post mortem* na mucosa gástrica, no fígado e nos rins de coelhos tratados por 90 dias com os colírios contendo DS e CT.

Sendo assim, esta tese foi dividida em capítulos, sendo os resultados apresentados em formato de artigo e formatados conforme a indicação do periódico a ser submetido: no primeiro artigo foram descritas as implicações da absorção sistêmica dos colírios contendo DS e CT. O segundo artigo referiu-se à avaliação ultraestrutural do epitélio corneano de coelhos tratados por 90 dias com os colírios de DS e CT sem conservantes.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Desde 1893, quando o químico alemão Felix Hoffman motivou a Bayer a produzir o ácido acetilsalicílico, patenteado como a Aspirina[®], os AINEs passaram a ser os fármacos mais prescritos e utilizados em todo o mundo. Contudo, apesar do largo uso desses agentes, o seu mecanismo de ação somente foi esclarecido em 1971, quando John Vane, laureado com o Prêmio Nobel pela sua descoberta, propôs que os anti-inflamatórios semelhantes à aspirina suprimem o processo inflamatório pela inibição da ciclooxigenase (COX), impedindo assim a síntese de prostaglandinas (CARVALHO et al., 2004). Fármacos AINE atuam inibindo as enzimas que degradam o ácido araquidônico: a ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase (LO). A inibição da COX acarreta na diminuição de endoperóxidos cíclicos, tais como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, que são importantes na mediação da dor e da inflamação. Os AINEs sistêmicos (Tabela 2) e tópicos são extensamente utilizados nos seres humanos e em animais com o propósito de aliviar e tratar condições dolorosas e inflamatórias agudas e crônicas. Os sinais de um processo inflamatório crônico podem perdurar por tempo indeterminado e geralmente acarretam sofrimento intenso para o paciente (JERICÓ; ANDRADE 2008; TASAKA, 2011).

Os efeitos adversos sistêmicos dos AINE em humanos e em animais ocorrem principalmente pela seletividade COX1/COX2, pelos diferentes parâmetros farmacocinéticos em cada espécie fazendo com que os AINE apresentem diversos tempos de meia-vida e eliminação, pelo tempo de tratamento, pelo estado geral de saúde do paciente e pela interação com outros fármacos (JERICÓ; ANDRADE 2008; TASAKA, 2011). Como a maioria dos AINE inibe indiscriminadamente COX-1 e COX-2, foram desenvolvidos compostos, denominados coxibes, com maior seletividade COX-2, diminuindo assim os efeitos adversos. Há mais de uma década, novas motivações para o uso clínico e para a pesquisa foram encontradas com a descrição de uma terceira variante da ciclooxigenase denominada de COX-3 (CARVALHO et al., 2004).

Tabela 2: Fármacos AINEs sistêmicos usualmente prescritos para cães, gatos e cavalos.

AINE	Espécie	Indicação	Dose e via de administração
Carprofeno	Canina	Anti-inflamatório e POI	≤ 4mg/Kg IV/SC/IM/VO
	Felina	POI	≤ 4mg/Kg SC
Flunixin meglumine	Canina	POI	0,25-1,0m /Kg IV/VO
	Felina	POI	0,25mg/Kg SC
	Equina	Anti-inflamatório	0,7mg/Kg IV/VO
Meloxicam	Canina	Anti-inflamatório e POI	≤ 0,2 mg/Kg IV/SC/VO
	Felina	Anti-inflamatório e POI	≤ 0,2 mg/Kg /SC/VO
	Equina	Anti-inflamatório	0,6mg/Kg IV
Cetoprofeno	Canina	Anti-inflamatório e POI	≤2 mg/Kg IV/SC/IM/VO
	Felina	Anti-inflamatório e POI	≤ 2 mg/Kg SC/VO
	Equina	Anti-inflamatório	2,2mg/Kg IV/IM
Fenilbutazona	Canina	Anti-inflamatório	10-14mg/Kg VO
	Equina	Anti-inflamatório	2,2-4,4mg/Kg IV/VO
Aspirina	Canina	Anti-inflamatório e AT	10mg/Kg VO
	Felina	Anti-inflamatório e AT	10-20mg/Kg VO
	Equina	Anti-inflamatório e AT	17mg/Kg VO
Cetorolaco	Canina	POI	0,3-0,5m /Kg IV/IM
	Felina	POI	0,25mg/Kg IM
Etodolaco	Canina	Anti-inflamatório	≤ 15mg/Kg VO
Deracoxibe	Canina	Anti-inflamatório	≤ 4mg/Kg VO

Abreviaturas: POI, pós-operatório imediato; AT, antitrombótico; IV, intravenoso; IM, intramuscular; SC, subcutâneo; VO, via oral. Fonte: adaptado de GIULIANO, 2004.

A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada e é expressa constitutivamente, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins, por isso a sua inibição ocasiona bloqueio da síntese de prostaglandinas nestes órgãos e células. Os efeitos adversos mais comuns da inibição da COX-1 são gastrites, gastroenterites, úlceras e hemorragias gástricas. Pacientes desidratados, ou com redução do fluxo sanguíneo renal, podem apresentar insuficiência renal aguda pelo uso de AINE. O uso crônico de AINE também pode causar nefropatia analgésica (nefrite crônica e necrose papilar renal) pela inibição de PGE2 e PGI2 e alterações hematológicas e cardiovasculares pelo bloqueio da agregação plaquetária devido à inibição de tromboxanos (JERICÓ; ANDRADE 2008; TASAKA, 2011). O diclofenaco, e o cetorolaco são AINEs inibidores não seletivos de COX-2 (CARVALHO et al., 2004). Há provas de que os AINEs

podem exercer outras ações anti-inflamatórias, além da inibição de COX: a supressão de leucócito polimorfonuclear, a locomoção celular e a quimiotaxia, que podem ocorrer como um efeito direto sobre os polimorfonucleares. Os AINEs também podem exercer efeitos anti-inflamatórios na desativação de radicais livres e na diminuição de superóxidos (GIULIANO, 2004; KATZUNG, 2005). Podem também, promover a infrarregulação da produção de interleucina-1 e a interferir nos eventos intracelulares mediados pelo cálcio (KATZUNG, 2005). Em modelos experimentais de alergia ocular, os AINEs diminuíram a expressão de citocinas inflamatórias, assim como a degranulação de mastócitos. Como ácidos orgânicos, os AINEs acumulam-se nos sítios da inflamação, reduzindo as células inflamatórias no local (GIULIANO, 2004). Os AINEs diminuem a sensibilidade dos vasos sanguíneos à bradicinina e à histamina, afetam a produção de linfocinas pelos linfócitos T e reverterem a vasodilatação (KATZUNG, 2005).

A prescrição de colírios a base de AINEs em oftalmologia vem aumentando nos últimos anos devido aos seus efeitos positivos nos resultados pós-operatórios de cirurgias de catarata e cirurgias refrativas. A inibição da liberação de prostaglandinas favorece a manutenção da midríase durante a cirurgia de catarata em pacientes que iniciam o tratamento antes do procedimento cirúrgico, e ainda, apresentam maior conforto com o uso no pós-operatório devido à eficácia analgésica destes fármacos (APPIOTTI et al., 1998; HERNANDEZ, 1999; STROOBANTS et al., 2000; GUIDERA et al., 2001; ZANETTI et al., 2012). Também são utilizados nos casos de abrasões corneais por promoverem algum grau de analgesia (SZUCS et al., 2000; ALBERTI et al., 2001). Não obstante, AINEs utilizados como analgésicos nas ceratites ulcerativas podem retardar a reparação e até potencializar a degradação do estroma corneal (LINN et al., 2000; GUIDER et al., 2001). Em cães com ceratite, Identificou-se a expressão de COX-2 no epitélio, no estroma e nas células endoteliais, permitindo comprovar que a expressão de COX-2 aumenta em todas as camadas da córnea quando há inflamação (SELLERS et al., 2004). Entretanto a COX-2 não é expressa em córneas de cães saudáveis (RADI; RENDER, 2008).

Os AINEs tópicos são utilizados por períodos prolongados para o tratamento de conjuntivites alérgicas crônicas, episclerites e no controle de uveítes (RUIZ; URRUTIA, 2004, KIM et al., 2010; DEHAR, et al., 2012). Ainda há poucos trabalhos avaliando a eficácia de AINEs tópicos no controle das uveítes, sendo ainda preferidos os corticosteroides, salvo em casos onde os anti-inflamatórios esteroidais são contraindicados (KIM et al., 2010). Formulações oftálmicas com AINEs são consideradas uma alternativa mais segura para

tratamentos prolongados do que aquelas com corticosteroides tópicos, a fim de evitar efeitos adversos como elevação da pressão intra-ocular (PIO), formação de catarata, infecções secundárias na superfície ocular e destruição do colágeno da córnea (STROOBANTS et al., 2000; GUIDERA et al., 2001; KIM et al., 2010). Também são muito utilizados na prevenção de edema macular em pessoas diabéticas cujo tratamento com corticosteroides tópicos interferem na estabilização da glicemia (IRIT 2011; ELSAWY et al., 2013).

Apesar de sua ampla utilização, os AINEs tópicos não estão isentos de importantes reações adversas. Em alguns pacientes sensíveis, o uso continuado de AINEs tópicos pode resultar em diminuição da sensibilidade corneana (SUN; GIMBEL; 1997), defeitos epiteliais persistentes, ceratite punctata superficial (GILLS, 1994; SHIMAZAKI et al., 1995), infiltrados estromais (SHER, et al 1994), infiltrados subepiteliais (PROBST; MACHAT, 1996), ulceração do estroma corneano (LIN et al; 2000), destruição do colágeno da córnea (FLACH, 2001; ASAI et al., 2006; ESTEROIDEOS, 2009) e perfuração da córnea (GUIDERA et al., 2001; DEMIREL, SARAC, 2012). Casos graves de necrose do colágeno da córnea ocorreram na década de 1990 após o uso de uma forma genérica de solução oftálmica de diclofenaco sódico 0,1% (FLACH, 2001). Apesar da preocupação com a possibilidade de necrose do colágeno da córnea, poucos estudos foram realizados correlacionando esta adversidade com os AINEs mais recentes, particularmente quando esses fármacos são usados em longo prazo. Além disso, os autores não conseguiram concluir se os casos de necrose foram realmente devido ao uso do AINE tópico, pois todos os relatórios clínicos mostravam co-morbidades e o uso de medicações tópicas concomitantes, além da presença de conservantes nas formulações (SINGER et al., 2012). O fabricante do cetorolaco de trometamina (Acular[®]) alerta que os pacientes que passaram por cirurgias oculares complicadas ou que apresentam defeitos no epitélio corneano, diabete melito, doenças da superfície ocular (por exemplo, síndrome do olho seco), artrite reumatóide, ou cirurgias oculares repetidas em curto espaço de tempo, possam ter risco maior para adensar eventos adversos corneanos graves. Ainda afirma, que tratamentos com AINE tópico por mais de 14 dias pós-cirurgia de córnea podem aumentar o risco de reações adversas locais, e recomenda que seja usado com cautela em pacientes com conhecidas tendências hemorrágicas ou que estejam recebendo outros medicamentos que possam prolongar o tempo de sangramento (ACULAR[®] LS, 2013). Entretanto, em um estudo recente, mais de 400 voluntários receberam tratamento com colírios de nepafenaco, bromfenaco e cetorolaco

quatro vezes ao dia por pelo menos três meses (média de 26 meses) e nenhum caso de derretimento do colágeno da córnea foi verificado (SINGER et al., 2012).

Efeitos adversos sistêmicos também podem ocorrer com o uso de AINE tópico, pois a absorção ocorre pela mucosa conjuntival e nasal (ISENBERG; EVERETT, 1984; BOWMAN et al., 2004; GIULIANO, 2004; LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010; KIM et al, 2010). Há relatos de exacerbação de asma brônquica em pessoas adultas após o uso tópico ocular de diclofenaco (SHARIR, 1997) e cetorolaco (SITENGA et al., 1996). Em oftalmologia veterinária foi observado que os efeitos adversos parecem ser espécie específicos e dependem também de outros fatores como idade, peso e predisposição individual (GIULIANO, 2004; KIM et al, 2010). Assim como em pediatria humana, em medicina veterinária pacientes com portes e pesos diferentes recebem a mesma dose do fármaco quando uma gota de colírio é instilada, o que pode predispor a reações adversas (ISENBERG; EVERETT, 1984; BOWMAN et al., 2004; LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010). Quando um colírio é instilado, a capacidade de retenção no saco conjuntival é de 25 a 30 microlitros, por isso foi estabelecido que o volume ideal para uma gota de colírio seja de 20 microlitros. No Brasil, entretanto, a maioria dos colírios tem aplicadores que fornecem uma gota de 50 microlitros, dessa forma, o excesso da mistura fármaco-lágrima transborda em parte pelas margens palpebrais e a outra parte é drenada pelas vias lacrimais e absorvida pela mucosa nasal (LIMA FILHO; BATISTUZZO, 2011).

Em medicina veterinária AINEs tópicos de uso humano são utilizados de maneira *extralabel* para condições inflamatórias oculares como ceratites e uveítes (HSU, 2013). Os AINEs tópicos também são utilizados no tratamento das ceratoconjuntivites em geral, inclusive as herpéticas felinas (HSU, 2013). Entretanto, o uso de AINES tópicos em infecções virais é controverso, alguns estudos apontam que não impedem a replicação viral e a formação de infiltrados subepiteliais autoimunes, e outros estudos apontam que o seu uso não causa piora no quadro (KIM et al., 2010). Na espécie felina, as uveítes crônicas ocorrem com bastante frequência, ocasionadas principalmente como manifestação de um distúrbio sistêmico. O tratamento consiste no controle da inflamação e da dor até que a causa seja diagnosticada e tratada, entretanto, muitas vezes a etiologia é imunomediada, sendo necessária uma manutenção anti-inflamatória para evitar recidivas (POWELL; LAPPIN, 2001; TOWNSEND, 2008). Entretanto, assim como em humanos, a corticoterapia tópica crônica em felinos pode resultar em efeitos adversos, inclusive incremento da pressão intraocular (ZHAN et al., 1992; BHATTACHERJEE et al., 1999; ORIÁ, 2013) e catarata

subcapsular posterior (GELATT, 2000b). Em cães glaucomatosos, de acordo com Martins e colaboradores (2009), alguns autores defendem que o uso de corticosteroides tópicos podem causar aumento da pressão intraocular (PIO) após três semanas de uso, enquanto outros autores afirmam que não há incremento importante da PIO. Em humanos, o fato de não influenciar na PIO de forma significativa é uma das principais vantagens dos AINEs tópicos quando utilizados por um longo período (STROOBANTS et al., 2000; GUIDERA et al., 2001). O ceterolaco de trometamina (Cetrolac[®], Acular[®]) e o diclofenaco sódico (Still[®], Voltaren[®]) fazem parte do grupo dos fármacos AINEs mais utilizados por via tópica ocular em medicina veterinária (GIULIANO, 2004; HSU, 2013).

Além dos AINEs, alguns colírios antimicrobianos e conservantes também podem causar toxicidade na superfície ocular (AYAKI, et al, 2010). Atualmente, o cloreto de benzalcônio (BAK - *benzalkonium chloride*) é o conservante mais comumente utilizado em soluções oculares. Vários estudos têm relatado sobre a toxicidade da córnea e da conjuntiva causada pela BAK, incluindo a perda de células, apoptose, alterações do citoesqueleto e alterações nas respostas imuno-inflamatórias (GUO et al., 2007; AYAKI, et al, 2010). Estudos apontam que outro conservante, o clorobutanol, induz citotoxicidade na concentração usual de 0,5% semelhante à observada para 0,01% de BAK. A concentração de BAK varia de 0,004% a 0,02%. O BAK tem baixo poder de penetração corneal, o que o leva a se acumular no epitélio da córnea. Um dos principais efeitos do BAK na superfície da córnea é a ruptura da barreira funcional do epitélio. Outros efeitos nocivos incluem: a acelerada descamação celular, o comprometimento da re-epitelização corneal em casos de úlceras e a interrupção da mitose celular (GUO et al., 2007; AYAKI et al., 2010).

2.1.1 Ceterolaco de Trometamina

O ceterolaco de trometamina é um ácido pirolizado, estruturalmente derivado da indometacina. É hidrossolúvel, o pKa é 3,5 e a massa molecular é 376,41g/Mol (ABIB, 2008). Inibe preferencialmente a COX-1 e não há evidências que tenha ação como inibidor de lipooxigenases (LO). É um dos fármacos AINEs com atividade analgésica mais potente, mas com moderada atividade anti-inflamatória. Foi o primeiro fármaco desta classe a ser aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para ser administrado por via intramuscular ou intravenosa (GILLIS; BROGDEN, 1997; KUMPULAINEN et al., 2008). Uma única dose de ceterolaco proporciona analgesia semelhante à da morfina, e com a vantagem de estar

associado a menores efeitos adversos do que os opióides, que causam vômito, depressão respiratória, prurido e sedação, sendo, portanto, considerado uma excelente alternativa no tratamento da dor peri-operatória na população pediátrica humana (COHEN et al., 2011).

O cetorolaco de trometamina é solúvel em água e mais de 99% do fármaco liga-se a proteínas plasmáticas, especialmente a albumina. Neonatos e bebês têm um volume relativamente elevado de água fracionada no corpo e uma menor concentração de proteínas plasmáticas, ocasionando um aumento da fração não ligada de fármacos, sendo, portanto contraindicado para crianças abaixo de dois anos de idade, que ficam mais susceptíveis aos efeitos adversos (ZUPPA, et al., 2009; COHEN et al., 2011). Após administração oral, o cetorolaco de trometamina é rapidamente absorvido, apresentando biodisponibilidade entre 90 e 100%, o que sugere pouco ou nenhum metabolismo pré-sistêmico. O tempo para atingir a concentração plasmática máxima é cerca de 60 minutos e ocorre um pouco depois em idosos, pacientes com nefropatias e hepatopatias. O pico de concentração plasmática aumenta linearmente com a dose (GILLIS; BROGDEN, 1997). A administração sistêmica prolongada, ou altas doses de cetorolaco podem causar insuficiência renal aguda, úlceras gástricas, e a inibição da atividade plaquetária (FELDMAN et al., 1997; ZUPPA, et al., 2009). Alguns autores concordam que o colírio de cetorolaco de trometamina, acrescido do conservante cloreto de benzalcônio, pode retardar a renovação e/ou regeneração do epitélio corneal (WATERBURY et al., 1987; COHEN et al. 1995).

Formulações oftálmicas de cetorolaco de trometamina atualmente disponíveis incluem uma solução a 0,5% (Acular[®], Allergan; Cetrolac[®], Genon) e uma solução a 0,4% (Acular LS[®]; Allergan), indicadas para a redução da inflamação e da dor ocular após cirurgias refrativas e de catarata e para alívio do prurido ocular na conjuntivite alérgica sazonal. Ambas estas formulações são indicadas para instilação até quatro vezes por dia (ATTAR et al., 2010). Em comparação com o diclofenaco sódico 0,1%, o cetorolaco de trometamina 0,5% demonstrou ser mais eficaz na inibição da miose e na manutenção da midríase durante a cirurgia de catarata (SRINIVASAN, 2002). Apesar da sua potência analgésica ser maior do que a ação anti-inflamatória, o cetorolaco de trometamina 0,5% também controla de forma satisfatória a inflamação ocular após cirurgia de catarata, sem o risco de aumentar a PIO, quando comparado com corticosteroides (DONNENFELD, 2012).

Na apresentação de colírio a 0,5% de cetorolaco de trometamina (Acular[®] Allergan), cada mL (35 gotas) contém: 5,0 mg de cetorolaco de trometamina e veículo composto de

cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, octoxinol 40, cloreto de sódio, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio para ajuste de pH e água purificada. O pKa do ceterolaco é de 3,5. Essa substância cristalina branca ou esbranquiçada tem sua cor alterada quando em exposição prolongada à luz. O peso molecular do ceterolaco de trometamina é de 376,41. A dose recomendada é de uma gota (0,143mg) até quatro vezes ao dia. Não requer condições especiais para armazenamento, antes ou depois de aberto deve ser mantido em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) e descartado após 30 dias. A segurança e eficácia de ceterolaco de trometamina 0,5% colírio não foram estabelecidas em crianças, mulheres grávidas ou que estejam amamentando, sendo, portanto, contra-indicados nestes grupos (ABIB, 2008; ACULAR[®], 2013).

2.1.2 Diclofenaco Sódico

O diclofenaco sódico é um sal derivado da estrutura do ácido 2-aminofenilacético. É um ácido fraco, pouco hidrossolúvel, com pKa de 4,18 que apresenta boa solubilidade em pH na faixa de 7,0-8,0. A massa molecular é 318g/Mol (MANCA et al., 2005). Promove inibição não-seletiva da COX e, ao contrário da grande maioria dos outros AINEs, também da LO. É um AINE de ação dual, por possuir alta potência anti-inflamatória e analgésica, sendo bastante utilizado em medicina humana. Experimentalmente, demonstrou ser eficaz quando utilizado no tratamento de miosites e artrite não-infecciosa em bovinos e bubalinos. Em cães o seu uso é restrito, sendo utilizado somente na forma tópica devido ao desenvolvimento de gastroenterite hemorrágica grave (JERICÓ; ANDRADE 2008; TASAKA, 2011). O diclofenaco sódico é muito utilizado na forma de colírio para tratamento de inflamações na superfície ocular e de uveítes em pequenos animais, mas a frequência de instilação e o tempo de tratamento são definidos de acordo com a gravidade da doença ocular independente do peso, idade, ou doença gastrointestinal progressiva do animal (GIULIANO, 2004; JERICÓ; ANDRADE, 2008; HSU, 2013).

A potência analgésica do diclofenaco administrado em dose oral de 150 mg é superior à de 60 mg de codeína, e a anti-inflamatória é superior à do ibuprofeno e inferior à do piroxicam. Estudos em analgesia em humanos indicam que a necessidade de opióides podem ser diminuídos quando o diclofenaco for administrado (CARVALHO, 2002; CARDOSO, 2002; KIM et al., 2010). A absorção por via oral e parenteral é rápida, levando cerca de 1,5 horas para atingir o pico de concentração plasmática. O diclofenaco liga-se quase que

totalmente (99,7%) a proteínas séricas, predominantemente à albumina. Como aproximadamente metade do diclofenaco é metabolizado durante sua primeira passagem pelo fígado, a área sob a curva de concentração após administração retal ou oral é cerca de metade daquela observada com uma dose parenteral equivalente. Cerca de 60% da dose administrada é excretada na urina como conjugado glicurônico da molécula intacta e menos de 1% é excretado como substância inalterada, sendo o restante da dose eliminado como metabólitos através da bile nas fezes (CARVALHO, 2002).

O diclofenaco sódico está disponível na forma de colírio a 0,1% e as principais apresentações comerciais são o Voltaren[®], Novartis e o Still[®] Allergan. O colírio Still[®] é uma solução estéril límpida, incolor a amarelada e levemente opalescente. Cada ml contém 1,0 mg de diclofenaco sódico (0,036 mg/gota) e o veículo é constituído por: ácido bórico, óleo de rícino, edetato dissódico, sulfito de sódio, digluconato de clorexidina e água purificada (ABIB, 2008; STILL[®], 2013). O diclofenaco sódico 0,1% é indicado para diminuir reações inflamatórias do segmento anterior do bulbo ocular, como conjuntivite crônica, ceratoconjuntivite, afecções pós-traumáticas dolorosas da córnea e conjuntiva, no pré e pós-operatório de cirurgias oculares, em ceratites e episclerites (KIM et al, 2010; STILL[®], 2013). Estudo recente aponta que o diclofenaco de sódio a 0,1 % é clinicamente e estatisticamente mais eficaz do que o ceterolaco de trometamina 0,5% no alívio da dor e no combate à inflamação nos casos de conjuntivite alérgica sazonal (DEHAR, et al., 2012).

O colírio Still[®] deve ser armazenado a temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) e ao abrigo da luz. Após aberto é válido por 60 dias. Diclofenaco sódico 0,1% é contraindicado para crianças abaixo de 14 anos. A segurança e eficácia de diclofenaco sódico 0,1% colírio não foram estabelecidas em mulheres grávidas ou que estejam amamentando, sendo, portanto, contra-indicados nestes grupos. Também é contra-indicado em pacientes com insuficiência hepática grave, insuficiência renal ou cardíaca. Deve ser administrado com cautela em pacientes com lesões gastrintestinais ativas ou histórico de lesões gastrintestinais causadas pelo uso de AINEs, e por pacientes com crises de asma, urticária ou rinite precipitadas por ácido acetilsalicílico ou outros agentes anti-inflamatórios não esteróides (ABIB, 2008; STILL[®], 2013).

2.2 Anatomia da superfície ocular e do sistema de drenagem nasolacrimal do coelho

A superfície anterior do bulbo ocular e a superfície interna das pálpebras são recobertas por um tecido epitelial onde as células, distribuídas em camadas, encontram-se firmemente justapostas. A principal função deste tecido é a proteção da superfície ocular da dessecação e da invasão microbiana. Também serve para a absorção de nutrientes dissolvidos na lágrima, como o oxigênio e a glicose (SOUSA et al., 2006). A conjuntiva é a membrana mucosa que reveste as faces internas das pálpebras e a superfície do terço anterior do olho, exceto a córnea. Ela permite movimentos independentes das pálpebras e do bulbo ocular, fornece muco para lubrificação e contém tecido linfoide para a proteção imunológica (SOUSA et al., 2006). Os vasos linfáticos presentes na conjuntiva representam a única drenagem linfática do bulbo ocular (GELATT, 2000). A terceira pálpebra, ou membrana nictante, possui nódulos linfóides em sua face bulbar e seu esqueleto é representado por uma cartilagem hialina em forma de “T”, tecido conectivo denso irregular, músculo esquelético, tecido adiposo e glândulas do tipo serosa e mucosa. A superfície é recoberta por epitélio escamoso estratificado não-queratinizado e a face bulbar possui um número maior de células caliciformes ou globosas (GELATT, 2000).

Em coelhos, a abertura do canal nasolacrimal, ou ponto lacrimal, está localizado na margem da superfície interior da pálpebra inferior, perto do ângulo nasal (Figura 1). Ao contrário do cão e do gato, coelhos não apresentam o ponto lacrimal na pálpebra superior. O ducto nasolacrimal deixa o saco lacrimal através de uma pequena abertura existente no osso lacrimal (o forame lacrimal) e avança rostral e medialmente até alcançar a lateral da raiz do dente incisivo e emergir na cavidade nasal (Figura 2) (HARCOURT-BROWN, 2002).



Figura 1: Imagem evidenciando a abertura do ponto lacrimal de um coelho sendo canulada (Fonte <https://www.vetlearn.com/compendium/excellence-in-exotics-practice-tip-nasolacrimal-duct-flushes-in-rabbits>).

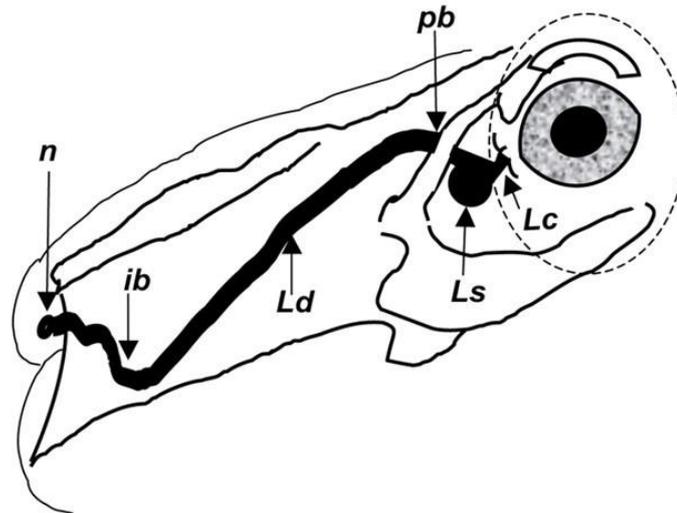


Figura 2: Representação esquemática do sistema nasolacrimal do coelho. O sistema do canal lacrimal é composto pelos canalículos lacrimais (Lc), saco lacrimal (Ls), ducto nasolacrimal (Ld), e o meato nasal (n). Há duas curvas acentuadas, a curva próxima ao osso maxilar (pb) e a curva próxima ao dente incisivo (ib) (Fonte: <http://cvi.asm.org/cgi/content-nw/full>).

A córnea, camada mais externa do bulbo do olho, apresenta estrutura e fisiologia semelhantes em humanos e animais. A sua forma é elíptica horizontal, embora em cães e gatos seja quase circular (BARROS, 1997). A espessura varia entre as espécies, sendo que coelhos adultos apresentam entre 0,3 e 0,37mm no centro e 0,4 e 0,43mm na periferia (PRINCE, 1965). Histologicamente, as camadas que constituem a córnea do coelho são quatro: epitélio com membrana basal, estroma, membrana de descemet e endotélio (Figura 3) (BARROS, 1997; SAMUELSON, 1999; STADES et al., 1999). A membrana limitante, ou membrana de Bowman, é facilmente encontrada em seres humanos, mas indistinta histologicamente na maioria dos animais, inclusive nos coelhos (BARROS, 1997).

O epitélio corneano do coelho, tal qual o humano, é formado por seis ou oito camadas celulares (GILBARD et al., 1984; BERGMANSON; WILSON, 1989). Em geral, o número de camadas celulares de epitélio da córnea das espécies mais utilizadas em pesquisas, incluindo o cão, gira em torno de seis a sete camadas (SHIVELY; EPLING, 1970). Desta forma, o epitélio anterior da córnea é definido como pavimentoso e estratificado, cujas células se diferenciam em três estratos: o mais profundo formado por uma camada de células basais, um

intermediário, formado por duas ou três camadas de células poligonais, e o mais superficial, formado por duas ou três camadas de células pavimentosas não queratinizadas, que estão em contato direto com o filme lacrimal (SOUSA et al., 2006).

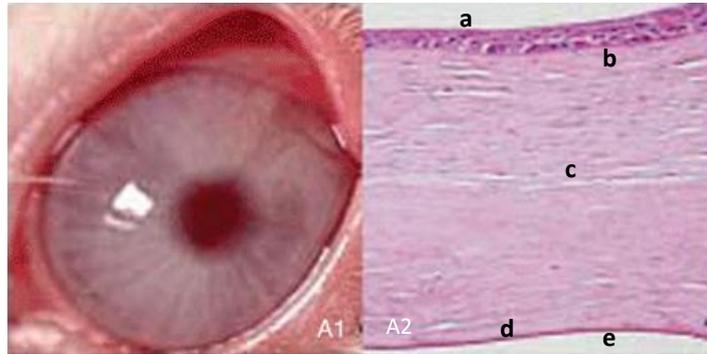


Figura 3: Córnea hígida de um coelho Nova Zelândia (A1). Corte histológico das camadas da córnea hígida de um coelho (A2). Epitélio (a), membrana basal (b), estroma (c), membrana de Descemet (d), endotélio (e) (Fonte: <http://www.researchgate.net>).

2.3 Análise ultraestrutural do epitélio da córnea

Para avaliação dos efeitos de fármacos sobre os tecidos vários são os tipos de estudos que podem ser realizados, dentre eles, a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV é um dos procedimentos metodológicos de investigação mais utilizados para observar com detalhes as características morfológicas quantitativas e qualitativas das células mais superficiais do epitélio da córnea (BURSTEIN; KLYCE, 1977; THERMES et al., 1991; PAWLEY, 1997; FERRAZ, et al., 2003; MORÁN, 2006). A MEV é um método experimental muito utilizado para identificar as alterações do epitélio da córnea frente ao uso de AINEs tópicos (STROOBANTS, 2000).

Na MEV, o epitélio corneano hígido aparece constituído por um mosaico de células aplanadas, poligonais, de tamanho irregular e luminosidade variável (claras, escuras e intermediárias ou cinzas) cuja superfície está coberta por numerosas microprojeções citoplasmáticas em forma de microvilosidades e criptas (Figura 4) em diferentes mamíferos (HOFFMAN, 1972; DOUGHTY, 1990; FERRAZ et al., 2003). Devido à renovação constante do epitélio da córnea, texturas celulares diferentes podem ser observadas em córneas sem alterações. As células claras apresentavam numerosas projeções e as escuras não. As células mais velhas descamam e perdem a habilidade de prender o filme lacrimal, o que contribui

para que se observem células de diferentes características (FERRAZ et al., 2003; MORÁN, 2006).

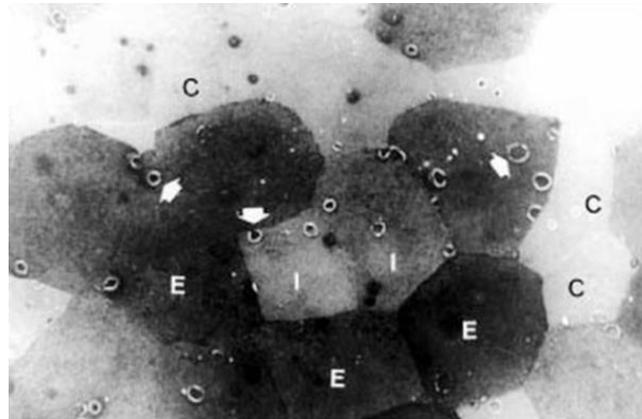


Figura 4: Avaliação ultraestrutural do epitélio corneano hígido de um coelho, com células hexagonais claras (C), escuras (E) e cinzas ou intermediárias (I). Presença de criptas (setas). Microscópio eletrônico de varredura 1110x (Fonte: FERRAZ, et al., 2003).

A origem das células claras, cinzas e escuras ainda não foi completamente elucidada. Segundo Pfister (1973) e Thoft & Friend (1983), os tipos celulares corresponderiam a diferentes estágios de maturação celular, onde as células claras seriam as mais jovens e as escuras as mais velhas. Entretanto, alguns autores discordam desta teoria, pois observaram que a descamação celular não ocorre em apenas um tipo celular e que há grande heterogeneidade nas células claras. Sendo assim acredita-se que as células claras, cinzas e escuras são fenótipos diferentes que amadurecem de forma paralela na superfície ocular (DOUGHTY, 1996; MORAN, 2006).

Em geral postula-se que a luminosidade celular (clara, cinza ou escura), depende da densidade e da morfologia longitudinal das microvilosidades presentes no epitélio. Sendo assim, células claras possuem mais microvilosidades e as escuras menos (STROOBANDS et al., 2000; MORAN, 2006).

Avaliações através de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a córnea é extremamente sensível a influências mecânicas, farmacológicas e metabólicas (FERRAZ et al., 2003). O epitélio da córnea é sensível a diversos medicamentos de uso tópico e a dose, o tempo de tratamento e fatores predisponentes do indivíduo interferem no potencial da toxicidade epitelial (GILLS, 1994; SHIMAZAKI, 1995, AYAKI et al., 2010). Alguns fármacos tópicos podem acentuar o fenômeno de descamação das células, aumentar o número

de células escuras e criptas, assim como de microplicas; além de causar modificações nas junções intercelulares, com aumento do espaço entre células adjacentes e perda do formato hexagonal (STROOBANTS et al., 2000; FERRAZ, et al., 2003).

O epitélio corneal passa por contínuo processo de autorrenovação, para se manter íntegro. A condição envolve contínua perda de células superficiais descamadas e a substituição celular a partir de camadas mais profundas. A atividade mitótica ocorre apenas nas células epiteliais basais, sendo a diminuição das células superficiais balanceada pela proliferação celular e por migração centrípeta. Assim, a descamação celular acelerada e a inibição da mitose celular, ou, a inibição da migração celular, podem levar à perda de células na camada superficial, afetando a integridade da barreira epitelial (THOFT & FRIEND, 1983).

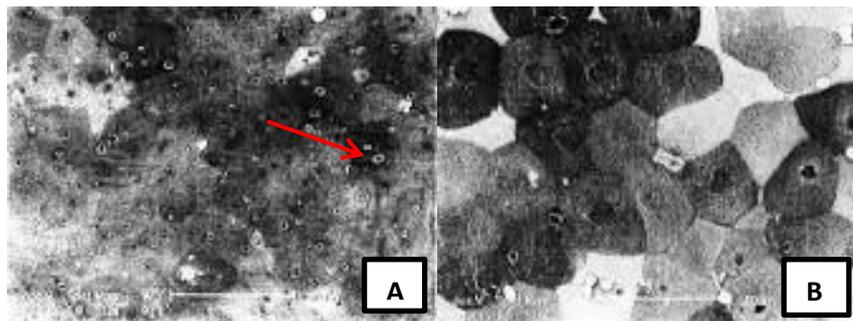


Figura 5: Exemplo de possíveis alterações no epitélio corneano de coelhos observadas através de microscopia eletrônica de varredura. **A**: aumento do número de criptas (seta). **B**: Aumento do número de células escuras. (Fonte: STROOBANTS et al., 2000).

2.4 Técnica analítica - Extração em fase sólida e espectrometria de massas

A extração em fase sólida (SPE - *solid phase extraction*), atualmente, é uma das técnicas mais utilizadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas, que se encontram em nível de traços, $\mu\text{g kg}^{-1}$ a ng kg^{-1} , sejam posteriormente detectados por métodos como: espectrometria de massas (MS – *mass spectrometry*), cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e eletroforese capilar. Essa é a etapa mais onerosa e demorada envolvida no processo analítico, consumindo cerca de 80% do tempo total de análise. Os principais objetivos da SPE são a remoção de interferentes da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos. O fator de

concentração é obtido pela razão entre o volume inicial de amostra aplicado no cartucho e o volume final de solução concentrada (JARDIM, 2010).

A espectrometria de massas está fortemente presente na indústria farmacêutica, desde a pesquisa de novos fármacos e formulações até o controle da qualidade. No Brasil, um segmento que vem ganhando cada vez mais importância econômica, inclusive trazendo divisas com a prestação de serviços na área de química analítica, é a análise de fármacos em amostras de plasma. A aplicação da espectrometria de massas à análise de compostos orgânicos é utilizada no Brasil há mais de 70 anos. Mesmo com o passar de tantos anos, a espectrometria de massas ainda é tratada, no Brasil, como uma ferramenta analítica praticamente restrita à pesquisa acadêmica (PEREIRA et al., 2005).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica extremamente valiosa em que as moléculas presentes em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa sobre a carga (m/z). Com o resultado desta relação m/z é possível identificar estes íons. Tal informação sobre a massa é muitas vezes suficiente na determinação da identidade de uma substância. Se uma biomolécula é ionizada pela adição de um ou mais prótons (íons H^+) o instrumento mede a m/z após a adição de 1 Da (Dalton) para cada próton adicionado. Moléculas também podem ser ionizadas perdendo um próton, adquirindo carga negativa. Nesta situação o espectrômetro passa a detectar íons de carga negativa. A ionização por *electrospray* é atualmente a mais utilizada para análise de fármacos (LANÇAS, 2009).

A ionização por *electrospray* (ESI) envolve a produção de íons através da formação de um *spray* da solução contendo o analito em um campo elétrico. O eletrospray cria gotículas carregadas através de um processo de nebulização. O solvente (em geral uma mistura de água e solvente orgânico 50:50) é removido a medida que as gotículas entram no espectrômetro de massas. O processo de ionização no ESI ocorre devido à aplicação de um forte campo elétrico que age sobre a superfície da gotícula. À medida que o solvente evapora na região de alto vácuo, o tamanho da gotícula diminui gradativamente até que sobre somente os íons livres do solvente (COLES, 2000; LANÇAS, 2009).

CAPÍTULO III

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cálculo do número amostral

Para determinar o tamanho da amostra (N) para a metodologia utilizada, foi realizado um cálculo com o auxílio do programa *GPower* 3 amostral, onde o N amostral foi calculado observando a média e o desvio padrão dos dados obtidos e descritos na literatura.

No presente estudo, para a realização da microscopia do epitélio da córnea, o olho contralateral não serviu como controle, ao contrário do observado na literatura (THERMES, et al., 1991; STROOBANTS et al., 2000; FERRAZ et al., 2003; MORÁN, 2010), tendo em vista que foi necessário um grupo controle para a avaliação da absorção sistêmica dos fármacos. Estudos sobre toxicidade crônica, farmacocinética e ação de medicamentos utilizam em média 20 animais (SINGH et al., 1986; SUBRAMANIAM et al., 2011; MARAN et al., 2012). Sendo assim, o tamanho da amostra necessário para se obter 0,05% de nível de confiança com a metodologia utilizada, foi estabelecido em 18 animais levando em consideração o caráter multifatorial do estudo.

3.2 Animais experimentais

Foram utilizados 18 coelhos da linhagem Nova Zelândia, albinos, fêmeas, com 90 dias de idade, pesando entre 2 e 2,5kg, hígdos, com padrão sanitário convencional. Os coelhos foram separados em três grupos. Aos 40 dias de tratamento um animal do grupo cetorolaco de trometamina teve morte subita de causa indeterminada. Todos os 17 animais tiveram ambos os olhos tratados por 90 dias (Tabela 3).

Tabela 3: Grupos experimentais e períodos de tratamento

GRUPO	Nº de COELHOS	PERÍODO DE TRATAMENTO
Controle (GC)	6 (12 córneas)	90 dias
Diclofenaco Sódico (GDS)	6 (12 córneas)	90 dias
Cetorolaco de Trometamina (GCT)	5 (10 córneas)	90 dias

Os animais foram mantidos no biotério do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS em condição constante de umidade (50-5%UR), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 8h30min às 20h30min) em gaiolas individuais de aço inoxidável, alimentados com ração padronizada e água *ad libitum*. O estudo iniciou após um período de adaptação de sete dias (Figura 6).

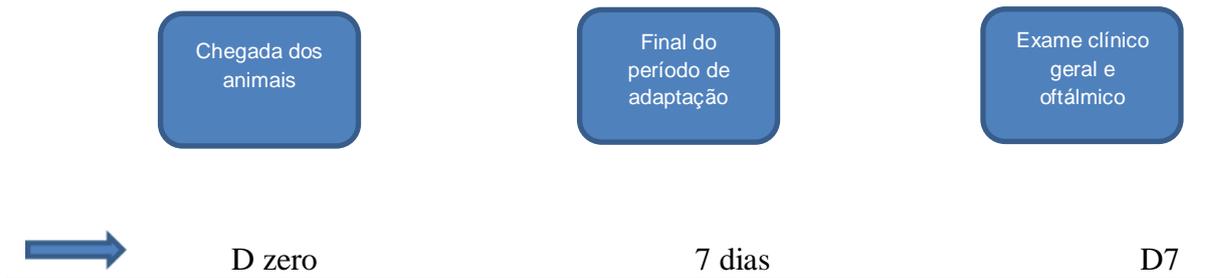


Figura 6: Linha de tempo demonstrando os procedimentos que foram realizados nos primeiros sete dias de acompanhamento dos animais.

3.3 Princípios éticos da pesquisa

Conforme o Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos (CEUA/UFRGS), o nível de severidade dos procedimentos envolvidos é considerado MODERADO, onde seja provável que os animais experienciem dor, sofrimento ou desconforto leves, cujo desfecho será a eutanásia (Tabela 4).

O alojamento, manejo e eutanásia dos animais seguiram a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e o Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009, respeitando-se também os princípios éticos na pesquisa experimental determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as diretrizes para prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

A fase experimental foi iniciada somente após a aprovação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, processo número 14-147/2014. Todos os procedimentos do ensaio foram conduzidos por profissionais habilitados, visando minimização do sofrimento animal e aplicação de sacrifícios humanizados.

Tabela 4: Grau de severidade dos procedimentos que foram realizados nos coelhos no presente projeto conforme o Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos (CEUA/UFRGS).

PROCEDIMENTO REALIZADO	GRAU DE SEVERIDADE
Exame clínico geral e oftalmológico com contenção mínima	Abaixo do limiar inferior
Coleta de sangue abaixo de 10% do volume corporal	Leve
Estudo de toxicidade crônica que possam produzir efeitos clínicos e desconforto moderados com desfecho não letal	Moderado
Eutanásia	Moderado

3.4 Exame clínico

Todos os animais foram submetidos ao exame clínico geral e oftalmológico prévio. O teste da lágrima de Schirmer (TLS), o teste da fluoresceína e da lissamina verde e a tonometria foram realizados somente no tempo zero de todos os grupos, a fim de não interferir na avaliação ultraestrutural do epitélio corneano no término dos tratamentos. O exame clínico geral e oftalmológico foi realizado sobre uma mesa, onde os coelhos foram contidos com uma toalha por um auxiliar treinado, em ambiente livre de ruídos e de outras espécies animais.

3.4.1 Exame clínico geral

Após aferição da temperatura, da frequência cardíaca e respiratória, todos os animais passaram por inspeção geral, avaliação de coloração de mucosas e foram pesados. Semanalmente, além de pesar os animais, foi observado o estado de alerta e coloração de mucosas. Esses parâmetros qualitativos do exame clínico foram interpretados por um sistema empírico através de cruzes (Tabela 5).

3.4.2 Exame clínico oftalmológico

O exame oftálmico realizado no tempo zero consistiu de: avaliação dos reflexos pupilares, inspeção da superfície ocular (presença de secreção ocular, hiperemia, blefarospasmo), teste da lágrima de Schirmer¹ (TLS), teste da lissamina verde², teste da fluoresceína³, biomicroscopia com lâmpada de fenda (BLF)⁴ e tonometria de aplanção⁵. Após a inspeção geral, o exame oftalmológico segue com o TLS, onde uma tira de papel filtro estéril milimetrado é colocada no meio do terço lateral do fórnix conjuntival inferior e deverá permanecer por 1 min. Ato contínuo, uma gota de colírio anestésico⁶ é instilada e a tira de lissamina verde é aproximada do limbo superior da córnea, onde uma gota de solução fisiológica é instilada sobre a tira para realização do contraste. Após a superfície ocular ser irrigada com solução fisiológica foi avaliada por BLF. O procedimento é repetido com a tira de fluoresceína. Assim como a córnea, a câmara anterior, o cristalino e o vítreo também foram examinados utilizando BLF. Para realização da tonometria de aplanção, outra gota de colírio anestésico é instilada permitindo que a ponta da sonda do aparelho toque na córnea suavemente e realize dez contatos, o que possibilita o cálculo da pressão intraocular média. Semanalmente, todos os bulbos oculares e anexos, de todos os grupos, foram avaliados através de BLF (Figura 1). A presença de blefarospasmo, secreção ocular e hiperemia conjuntival eram interpretadas conforme a tabela 5.

Tabela 5: Forma de avaliação dos parâmetros qualitativos da avaliação clínica e oftalmológica semanal:

EXAME SEMANAL	-	+	++	+++
Estado de alerta	Alerta	Apatia	Estupor	Coma
Coloração de mucosas	Normocorada	Hipocorada	Congesta	Cianótica
Blefarospasmo	Ausente	Esporádico	Constante	Intenso
Secreção ocular	Ausente	Leve	Moderada	Intensa
Hiperemia ocular	Ausente	Leve	Moderada	Intensa

¹ Teste da lágrima de Schirmer strips, Ophthalmos ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil.

² Lisamina strips, Ophthalmos ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil.

³ Fluoresceína strips, Ophthalmos ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil.

⁴ Kowa® SL-15 Slit-lamp Biomicroscope, Japão.

⁵ TonoPen® AVIA, Reichert Technologies, EUA.

⁶ Anestésico®, Allergan, ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil.



Figura 7: Biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa® SL-15) em um coelho da raça Nova Zelândia.

3.5 Protocolo de Tratamento Clínico

Os três grupos (GC, GDS, GCT) foram avaliados por 90 dias e ambos os olhos de todos os coelhos foram tratados três vezes ao dia conforme o grupo (Tabela 6). Os colírios de Diclofenaco Sódico 0,1% e de Cetorolaco de Trometamina 0,5% foram manipulados sem conservantes (Ophthalmos ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil).

Tabela 6: Grupos experimentais e protocolo de tratamento clínico:

GRUPO	COLIRIO	FREQUENCIA
Controle (GC)	Solução Fisiológica (NaCl 0,9%)	Três vezes ao dia
Diclofenaco (GDS)	Diclofenaco sódico 0,1%	Três vezes ao dia
Cetorolaco (GCT)	Cetorolaco de trometamina 0,5%	Três vezes ao dia

3.5.1 Mensuração do Consumo de água e ração

Os animais receberam durante o experimento água e ração específica para a espécie (Nuvital®) de forma *ad libitum*. Diariamente, ao final do dia, era quantificado o consumo de

água e ração, sendo os dados anotados em uma planilha. Qualquer observação quanto ao comportamento, aspecto da urina e das fezes também eram anotados nesta mesma planilha.

3.6. Coleta de sangue

Aos 30 dias do experimento, após a adaptação de sete dias (D7a), todos os animais passaram por coleta de sangue. A contenção foi realizada por um auxiliar treinado, onde os animais foram enrolados em uma toalha, deixando apenas a região do pescoço e da cabeça expostas. A região do pescoço foi tricotomizada com máquina de tosa lâmina n° 40 para o vaso ser visibilizado e facilitar a coleta a partir de venopunção da veia jugular com agulha descartável calibre 25x7. O procedimento de coleta de sangue foi repetido também aos 60 e 90 dias, em todos os grupos (GC, GDS e GCT). O sangue foi armazenado em tubos próprios, com e sem anticoagulante e enviado imediatamente para análise no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS (LACVET).

3.7 Análises laboratoriais

As avaliações em 30, 60 e 90 dias consistiram em análise hematológica e método analítico para a identificação dos princípios ativos dos fármacos no plasma.

- a) **Análise hematológica:** Hemograma e leucograma completos, contagem de plaquetas, e tempo de protrombina e tromboplastina, creatinina, proteínas totais, albumina, sódio e potássio.
- b) **Método analítico:** extração em fase sólida (SPE) e detecção por espectrometria de massas (MS).

3.7.1 Metodologia Analítica: extração em fase sólida (SPE) e detecção por espectrometria de massas (MS).

Com o objetivo de detectar o ceterolaco de trometamina e o diclofenaco sódico no plasma dos coelhos, as amostras de sangue foram coletadas aos 30, 60 e 90 dias de tratamento. A metodologia utilizada foi semelhante à descrita por Suenami et al (2006). As amostras foram centrifugadas e o plasma coletado de cada amostra foi congelado na

temperatura de -80°C em *ependorfs* de 1mL. O processo de descongelamento ocorreu em banho maria na temperatura de 37° . A cada amostra de plasma de 0,5mL, foi acrescentado 0,1mL de ácido fosfórico e ainda diluída em 0,5mL de água ultrapura. Após a preparação, as amostras foram levadas ao vortex por 1 minuto.

A metodologia utilizada para cada princípio ativo foi a mesma, entretanto realizadas separadamente. Para a realização da SPE, foram utilizados catuchos (Oasis HLB 3 cc Vac Cartridge, 60 mg Sorbent per Cartridge, 30 μm Particle Size, 100/pk) condicionados com 2mL da mistura de solvente dietil eter/metanol (90:10), 2mL de metanol, seguido de 2mL de água miliQ. Após esse processo, foi adicionada a amostra do plasma preparado (0,5mL + 0,1mL de ácido fosfórico e diluída em 0,5mL de água ultrapura). Após a eluição o cartucho foi lavado com 2mL de água ultrapura para retirar as impurezas e os analitos foram eluidos com a mistura de solvente dietil eter/metanol (90:10). Por fim, para a detecção por MS, uma alíquota de 5 μl foi injetada no aparelho QToF - QIII Bruker com fonte de Electrospray (ESI +) utilizando uma bomba de seringa a um fluxo de 180 microlitros por hora no modo positivo de análise. Nos espectros adquiridos apenas íons positivos foram visualizados.

Esta etapa do estudo foi realizada no laboratório de bioquímica e de química analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

3.8 Eutanásia dos animais experimentais

Após o período de tratamento estipulado em 90 dias, os animais foram eutanasiados por um médico veterinário experiente seguindo as diretrizes para prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013), de acordo com a recomendação do CEUA – UFRGS. Os coelhos serão contidos individualmente com uma toalha e conduzidos para uma sala sem ruídos e sem a presença de outros animais. Para minimizar o estresse e promover relaxamento muscular, primeiramente os coelhos foram anestesiados com cetamina, na dosagem de 60 mg/kg, e xilazina, na dosagem de 8 mg/kg, associadas em uma seringa com agulha calibre 25X7, por via intramuscular. Em seguida, será realizada a venóclise da veia auricular com cateter flexível nº 24 para aprofundamento da anestesia, utilizando-se tiopental sódico, na dosagem de 50 mg/kg. Após constatada a perda da consciência, será aplicado cloreto de potássio por via IV, provocando a parada cardiorrespiratória. Antes que outro coelho fosse conduzido para a sala de eutanásia, esta foi

limpa e a carcaça conduzida para outra sala onde seguirão os procedimentos de coleta das amostras.

3.9 Obtenção e preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O preparo do epitélio da córnea para a MEV foi realizado conforme descrito por Morán (2006), onde, imediatamente após o óbito do animal as córneas foram irrigadas com solução fixadora de Karnovsky mol/L, para que o tempo post-mortem de todas as córneas fosse nulo. A composição da solução fixadora de Karnovsky é a seguinte (por 100mL):

Tampão Fosfato 0,2M a pH 7,39*.....	50 mL
Paraformaldeído 8%.....	25 mL
Glutaraldeído 25%.....	10 mL
Água destilada.....	15mL

* resultante da dissolução aquosa de fosfato monossódico 3,21% e fosfato disódico 3,56% m proporção 2:8

Em seguida, os bulbos oculares foram enucleados subconjuntivalmente e submersos na solução fixadora de Karnovsky mol/L⁻¹ por 15 min. Desta forma todas as camadas da córnea entraram em contato com o fixador. As córneas foram removidas por peritomia límbica em 360°, formando um anel córneo-escleral com lâmina de bisturi nº 15 à aproximadamente 2 mm do limbo corneano. As amostras foram mantidas na solução de Karnovsky mol/L, sob refrigeração, por 5 dias, a fim de manter a superfície corneana completamente lisa.

Posteriormente à conservação, as amostras foram submetidas à desidratação em séries crescentes de álcool etílico (50, 60, 70, 80, 90 e 100%), durante 15 minutos respectivamente. Na sequência, as amostras foram dessecadas, substituindo gradativamente o álcool do meio por hexametildisilazano para evitar a contração das amostras durante a secagem. Para isto, as amostras serão submersas seriadamente em soluções de álcool absoluto e hexametildisilazano nas seguintes proporções: 3:1, 2:2, 1:3, permanecendo em cada solução por 15 minutos. Em seguida as córneas serão submersas em um recipiente aberto com hexametildisilazano puro, até que este evapore completamente. Após, as amostras foram levadas até o Centro de

Microscopia Eletrônica da UFRGS, onde foram acondicionadas em porta-espécime, com a camada epitelial para cima, com fita condutiva de cobre e cola de carbono, sendo metalizadas com uma camada de ouro e paládio de 35nm de espessura.

Ato contínuo, cada amostra foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura⁷. Foram realizadas no mínimo três eletromicrografias da área central do epitélio de cada córnea em diferentes aumentos. Ao aumento de 500x foram contabilizadas 70 células epiteliais por campo. Em cada campo foi observado:

- O número de células escuras, cinzas e claras.
- O número de criptas.
- O formato hexagonal das células.

O dano sobre o formato hexagonal das células foi graduado conforme um sistema empírico de escore de zero a cinco. Onde zero significava que todas as células presentes no campo apresentavam um perfeito formato hexagonal, e o escore cinco representava a perda total do formato hexagonal em todas as células presentes no campo.

3.10 Necropsia e histopatologia

A necropsia foi realizada no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS. Foram avaliadas a mucosa gástrica e pilórica, rins e fígado de todos os grupos após os 90 dias de tratamento.

Após o exame macroscópico foram coletados fragmentos desses órgãos para a realização de exame histopatológico.

3.11 Descarte de resíduos químicos e biológicos

O material contaminado foi descartado através de serviço especializado de coleta de descarte de resíduos. Os perfurocortantes foram acondicionados em caixas Descarpack rígidas (que não permitem rupturas) até que atingissem 2/3 da sua capacidade. As caixas eram semanalmente recolhidas pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho da Unidade.

Os resíduos químicos foram separados, rotulados e encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) da UFRGS.

⁷ Microscópio eletrônico de varredura-JSM 6060, JEOL, Tóquio, Japão.

Após a eutanásia dos animais, a remoção dos bulbos oculares e a necropsia, a carcaça e demais resíduos biológicos oriundos desses processos, foram acondicionados em saco plástico branco e descartados conforme o Plano de Gestão de Resíduos em Serviço de Saúde da UFRGS, de acordo com a RDC 306 de 2004.

3.12 Análise estatística

O consumo de água e ração, assim como o peso dos animais foram descritos segundo grupos e momentos de avaliação com o uso de média e desvio padrão (KIRKWOOD; STERNE, 2006). Foram calculados os ganhos de peso dos animais e descritos segundo grupos. O consumo de água e ração foram comparados entre os grupos e momentos controlando o peso inicial dos animais com uso de ANOVA com medidas repetidas com dois fatores, tendo o peso inicial como covariável na análise (NETER et al., 1996). O peso foi comparado entre os grupos e momentos com uso de ANOVA com medidas repetidas com dois fatores e o ganho de peso foi comprado entre os grupos com uso de ANOVA, tendo o peso inicial como covariável na análise (NETER et al., 1996).

O número de células avaliadas e a perda de formato foram descritos segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas entre os grupos com o uso de testes Kruskal-Wallis (NETER et al., 1996), seguidos de comparações múltiplas de Dunn (NETER et al., 1996) quando necessárias.

Foram calculadas as correlações de Spearman (KIRKWOOD; STERNE, 2006) entre o número de células escuras com a contagem das demais células e com a perda de formato, tanto no total de córneas avaliadas como separadamente por grupos. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

CAPÍTULO IV

ARTIGO 1:

A Avaliação das repercussões sistêmicas do uso tópico ocular de cetorolaco de trometamina e diclofenaco sódico em coelhos da raça Nova Zelândia

Evaluation of systemic effects of topical ocular use of ketorolac tromethamine and diclofenac sodium in New Zealand rabbits

Fabiana Quartiero Pereira, Bruna Santos; Melina Bender Macedo, Tanise Carboni, Mariana Dreyer, Cláudia Faganello, Priscila Ramirez Silva, Marla N. Godoi Biajoli, Ana Cunha, David Driemeier, João A. T. Pigatto, Fernanda Bastos de Mello, João R. Braga de Mello

Manuscrito submetido para a revista *Ciência Rural*

RESUMO

Comparou-se os efeitos da absorção sistêmica do colírio de diclofenaco sódico 0,1% em relação ao de cetorolaco de trometamina 0,5%, em coelhas híginas da raça Nova Zelândia tratadas três vezes ao dia, nos dois olhos, por 90 dias. As coelhas foram separadas em três grupos com seis animais cada (n=18): grupo cetorolaco de trometamina (GCT), grupo diclofenaco sódico (GDS) e grupo controle (GC), onde foi instilada solução fisiológica (NaCl 0,9%). Foi realizada a mensuração diária do consumo de água e ração, assim como exames clínicos semanais e coleta de sangue a cada 30 dias. Entretanto, não houve alterações clínicas e diferenças estatísticas significativas entre os grupos quanto aos valores de hemograma,

leucograma, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e tromboplastina, proteínas totais, albumina, creatinina, sódio e potássio. Após noventa dias de tratamento, o plasma foi analisado por extração em fase sólida (SPE) associada à espectrometria de massas (MS), sendo possível detectar a presença do cetorolaco de trometamina e do diclofenaco sódico. . Um indivíduo do grupo cetorolaco teve morte súbita, de causa indeterminada. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e necropsiados, sendo que os resultados não apontaram alterações macro ou microscópicas no sistema gástrico, hepático e renal. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a metodologia analítica SPE-MS foi eficaz na identificação destes fármacos no plasma e o tratamento três vezes ao dia com colírios contendo cetorolaco de trometamina 0,5% e de diclofenaco sódico 0,1% é bem tolerado por 90 dias em coelhos hígidos, apesar de haver absorção sistêmica.

Palavras chave: Colírio, AINE, absorção sistêmica, coelhos.

ABSTRACT.

The effects of systemic absorption of diclofenac sodium eyedrop 0.1% were compared to ketorolac tromethamine 0.5% in healthy New Zealand female rabbits treated three times a day on both eyes for 90 days. The rabbits were divided into three groups of six animals (n = 18): ketorolac tromethamine group (KTG), diclofenac sodium group (DSG) and control group (CG), in which saline solution (NaCl 0.9%) was instilled. Daily measurement of the consumption of water and food, as well as weekly clinical examination and blood sampling was done every 30 days. However, there were no clinical and statistically significant differences between the groups regarding blood count, white blood cell count, platelet count, prothrombin and thromboplastin time, total protein, albumin, creatinine, sodium and potassium. Ninety days after the treatment, the plasma was analyzed by solid phase extraction (SPE) associated with mass spectrometry (MS), which can detect the presence of ketorolac

tromethamine and diclofenac sodium. One rabbit of the ketorolac group died suddenly of unknown causes. At the end of the treatment the animals were euthanized and necropsied, and the results showed neither macroscopic nor microscopic changes in the gastric, hepatic and renal system. According to the results, it can be concluded that the PES-MS analytical method was effective in identifying these drugs in the plasma and the three times daily administered treatment with eyedrops containing ketorolac tromethamine 0.5% and diclofenac sodium 0.1% is well tolerated for 90 days in healthy rabbits, although there is systemic absorption.

Keywords: Eyedrops, NSAIDs, systemic absorption, rabbits.

INTRODUÇÃO

Os AINEs são uma das classes de medicamentos mais utilizadas em todo o mundo. São indicados para humanos e animais com o propósito de alívio sintomático de condições dolorosas e inflamatórias agudas ou crônicas (JERICÓ; ANDRADE, 2008). A inibição das enzimas ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) promove a ação anti-inflamatória e analgésica (ARAGONA, et al 2000; JERICÓ; ANDRADE, 2008; TASAKA, 2011). O tipo de AINE, a seletividade COX-1/COX-2, a meia vida de eliminação e o tempo de tratamento são os principais fatores que desencadeiam efeitos adversos em humanos e animais (JERICÓ; ANDRADE, 2008). Os conhecimentos da farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos, em especial dos anti-inflamatórios, são de suma importância, pois a meia vida de uma mesma substância difere muito entre as espécies animais em que são empregadas (TASAKA, 2011).

Em animais, os efeitos adversos do uso sistêmico de alguns AINEs são bem documentados: distúrbios gastrointestinais, discrasias sanguíneas; hipoproteïnemia; broncoconstrição; hepatopatia; nefrotoxicidade e anormalidades fetais (GIULIANO, 2004, JERICÓ; ANDRADE, 2008; TASAKA, 2011). Vários fatores devem ser levados em

consideração durante a utilização de anti-inflamatórios, como nefropatias, hepatopatias e a idade do paciente, onde, animais muito jovens apresentam o sistema enzimático hepático imaturo e os idosos não possuem a mesma eficiência renal e hepática de adultos jovens (TASAKA, 2011).

Frente à diversidade de AINEs disponíveis no mercado, poucos são os aprovados para o uso em animais, pois faltam estudos em médio e longo prazo para determinar a segurança, a eficácia e as doses apropriadas para cada espécie. Após aprovado um fármaco para uso veterinário e a dose estabelecida para cães, normalmente faz-se uma extrapolação, com ajuste da dose recomendada para outras espécies, principalmente felinos. Esta prática pode resultar em reações adversas e intoxicações (BOOTHE, 1990; MACY, 1994, SPARKES et al., 2010). A mesma extrapolação de indicação terapêutica ocorre com o uso de colírios contendo AINEs aprovados para o uso em humanos (HSU, 2013). Vários AINEs tópicos estão atualmente aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA): o diclofenaco, o ceterolaco, o flurbiprofeno, o suprofen, o bromfenaco, o nepafenaco e a indometacina. Este último é disponível somente no Canadá e na Europa (ZANETTI et al., 2012, HSU, 2013). Os mais utilizados em oftalmologia veterinária são o diclofenaco, o ceterolaco e o flurbiprofeno (GIULIANO, 2004; HSU, 2013).

Efeitos adversos sistêmicos também podem ocorrer com o uso de AINE tópico, pois a absorção ocorre pela mucosa conjuntival e nasal (ISENBERG; EVERETT, 1984; SITENGA et al., 1996; SHARIR, 1997; BOWMAN et al., 2004; GIULIANO, 2004; LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010; KIM et al, 2010).

Com este estudo objetivou-se investigar os potenciais efeitos adversos locais e sistêmicos do tratamento por 90 dias com colírios contendo diclofenaco sódico 0,1% e ceterolaco de trometamina 0,5%, manipulados sem conservantes. Desta forma buscou-se

elucidar questões relacionadas à segurança do seu uso como agente terapêutico, que poderiam restringir a sua aplicação clínica em pequenos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Após a realização do exame clínico geral e oftálmico, foram selecionados 18 coelhos da linhagem Nova Zelândia, albinos, fêmeas, com 90 dias de idade, pesando entre 2 e 2,5kg, hígdos, com padrão sanitário convencional. Os animais foram mantidos no biotério do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS em condição constante de umidade (50-5%UR), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 8h30min às 20h30min) em gaiolas individuais de aço inoxidável, alimentados com ração padronizada e água *ad libitum*.

Grupos estudados

Os 18 animais foram divididos em três grupos (cetorolaco de trometamina, diclofenaco sódico e controle) com seis animais cada. Os animais foram tratados com colírio contendo cetorolaco de trometamina 0,5% (Ophthalmos ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil) ou diclofenaco sódico 0,1% (Ophthalmos ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil) em cada olho, três vezes ao dia durante 90 dias, de acordo com o grupo. Os colírios foram manipulados sem conservantes. No grupo controle foi instilada solução fisiológica (NaCl 0,9%).

Parâmetros avaliados

Diariamente foi mensurado o consumo individual de água e ração. Semanalmente, além de pesar os animais, foi observado o estado de alerta e a coloração das mucosas. As córneas e os anexos oculares, de todos os grupos, também foram avaliados semanalmente através de biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa® SL-15 Slit-lamp Biomicroscope, Japão). Coletas de sangue foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias de tratamento para os seguintes

exames laboratoriais: hemograma, leucograma, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e tromboplastina, proteínas totais, albumina, creatinina, sódio e potássio, além de análise química para identificar os AINEs no plasma por extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*) e detecção por espectrometria de massas utilizando fonte de ionização por *Electrospray* no modo positivo (ESI(+)-MS – *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*). Como um indivíduo teve morte súbita aos 45 dias de tratamento, aos 90 dias 17 coelhos foram eutanasiados e necropsiados em busca de alterações gástricas, hepáticas e renais.

Metodologia Analítica (SPE/ESI(+)-MS)

Com o objetivo de detectar o ceterolaco de trometamina e o diclofenaco sódico no plasma dos coelhos, as amostras de sangue foram coletadas aos 30, 60 e 90 dias de tratamento. A metodologia utilizada foi semelhante à descrita por Suenami et al (2006). As amostras foram centrifugadas e o plasma coletado de cada amostra foi congelado na temperatura de -80°C em *ependorfs* de 1mL. O processo de descongelamento ocorreu em banho maria na temperatura de 37° . A cada amostra de plasma de 0,5mL, foi acrescentado 0,1mL de ácido fosfórico e ainda diluída em 0,5mL de água ultrapura. Após a preparação, as amostras foram levadas ao vortex por 1 minuto.

A metodologia utilizada para cada princípio ativo foi a mesma, entretanto realizadas separadamente. Para a realização da SPE, foram utilizados catuchos (Oasis HLB 3 cc Vac Cartridge, 60 mg Sorbent per Cartridge, 30 μm Particle Size, 100/pk) condicionados com 2mL da mistura de solvente dietil eter/metanol (90:10), 2mL de metanol, seguido de 2mL de água miliQ. Após esse processo, foi adicionada a amostra do plasma preparado (0,5mL + 0,1mL de ácido fosfórico e diluída em 0,5mL de água ultrapura). Após a eluição, o cartucho foi lavado com 2mL de água ultrapura para retirar as impurezas, e os analitos foram eluidos com a mistura de solvente dietil eter/metanol (90:10). Por fim, para a detecção por ESI(+)-MS, uma alíquota de 5 μl foi injetada no aparelho QToF - QIII Bruker com fonte de

Electrospray -ESI (+) utilizando uma bomba de seringa a um fluxo de 180 microlitros por hora no modo positivo de análise, de forma que apenas moléculas carregadas positivamente possam ser detectados.

Análise estatística

O consumo de água, ração e o peso dos animais foram descritos segundo os grupos e os momentos de avaliação com o uso de média \pm desvio padrão (KIRKWOOD; STERNE, 2006). Também foi calculado o ganho de peso dos animais e descrito de acordo com os grupos. O consumo de água e ração foi comparado entre os grupos e os momentos, controlando o peso inicial dos animais com uso de ANOVA com medidas repetidas com dois fatores, tendo o peso inicial como covariável na análise (NETER, et. al., 1996). O peso foi comparado entre os grupos e momentos com uso de ANOVA com medidas repetidas com dois fatores, e o ganho de peso foi comparado entre os grupos com uso de ANOVA, tendo o peso inicial como covariável na análise (NETER, et. al., 1996). Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos adversos sistêmicos dos AINEs em humanos e em animais ocorrem principalmente pela seletividade COX1/COX2, e pelos diferentes parâmetros farmacocinéticos em cada espécie, fazendo com que os AINEs apresentem diversos tempos de meia-vida e eliminação. Os AINEs podem exercer outras ações anti-inflamatórias, além da inibição de COX. Pode ocorrer a supressão de leucócitos polimorfonucleares, além de alterações hematológicas e cardiovasculares pelo bloqueio da agregação plaquetária devido à inibição de tromboxanos (GIULIANO, 2004; KATZUNG, 2005; JERICÓ; ANDRADE 2008; TASAKA, 2011). Os efeitos adversos mais comuns da inibição da COX-1 são gastrites, gastroenterites, úlceras e hemorragias gástricas. Pacientes desidratados, ou com redução do

fluxo sanguíneo renal, podem apresentar insuficiência renal aguda pelo uso de AINE. O uso crônico de AINE também pode causar nefrite crônica e necrose papilar renal pela inibição de PGE2 e PGI2 (JERICÓ; ANDRADE 2008; TASAKA, 2011). Quanto aos efeitos adversos locais, a literatura relata alguns casos de defeitos epiteliais persistentes e ceratite punctata superficial (GILLS, 1994; SHIMAZAKI et al., 1995), infiltrados estromais (SHER, et al 1993) e infiltrados subepiteliais (PROBST; MACHAT, 1996), ulceração do estroma corneal (LIN et al; 2000), destruição do colágeno da córnea (ASAI et al., 2006; ESTEROIDEOS, 2009) e perfuração da córnea (GUIDERA et al., 2001; DEMIREL, SARAC, 2012). No presente estudo, durante os 90 dias de tratamento com os colírios de cetorolaco de trometamina 0,5% e com diclofenaco sódico 0.1%, nenhum animal apresentou desconforto ocular e alterações na córnea, conjuntiva e anexos oculares que pudessem ser identificadas à biomicroscopia com lâmpada de fenda.. Também não foram identificadas alterações clínicas quanto ao estado de alerta e coloração de mucosas. Quanto aos exames laboratoriais, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto aos valores de hemograma e leucograma, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e tromboplastina, proteínas totais, albumina, creatinina, sódio e potássio.

Efeitos adversos sistêmicos também podem ocorrer com o uso de AINE tópico, pois a absorção ocorre pela mucosa conjuntival e nasal (ISENBERG; EVERETT, 1984; BOWMAN et al., 2004; GIULIANO, 2004; LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010; KIM et al, 2010). A absorção sistêmica dos AINEs foi comprovada pela metodologia analítica SPE-ESI(+)-MS. A SPE, atualmente, é uma das técnicas mais utilizadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas, que se encontram em nível de traços, $\mu\text{g kg}^{-1}$ a ng kg^{-1} , sejam posteriormente detectados por outros métodos, como a MS (JARDIM, 2010). Nesta técnica, o limite para detecção do diclofenaco é de aproximadamente 2 ng mL^{-1} (EMAMI et al., 2007). A MS é uma

técnica analítica extremamente valiosa onde átomos e moléculas são mensurados para determinar suas massas moleculares. Esta informação sobre a massa com exatidão é suficiente para determinar a identidade de um composto químico. A utilização de ESI(+)-MS permite que moléculas neutras de um analito sejam convertidas em íons após passarem por várias combinações de campos elétricos e magnéticos sob vácuo (LANÇAS, 2009). A fórmula química do diclofenaco sódico é $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ e do cetorolaco de trometamina é $C_{15}H_{13}NO_3C_4H_{11}NO_3$, apresentando, respectivamente, pesos moleculares de 318,1 g/mol e de 376,41 g/mol.

Valendo-se desta metodologia, e utilizando somente o modo positivo de análise, íon 318 (+) nas amostras correspondentes aos 60 e 90 dias de tratamento do grupo diclofenaco sódico foi detectado o íon 256 (+) somente nas amostras correspondentes aos 90 dias de tratamento do grupo cetorolaco de trometamina e o (**Tabela 1**).

Doses diárias efetivas de aproximadamente 0,25-0,5mg de diclofenaco sódico administrados na forma de colírio (3-5 gotas diárias) são equivalentes a menos de 1% da dose diária recomendada por via oral indicada para tratamento de doenças reumáticas em pessoas. A absorção local na córnea e na conjuntiva é rápida, ocorrendo 30 minutos após a instilação (ABIB, 2008). Após a absorção de um medicamento, este pode ficar livre no sangue, ligar-se a proteínas plasmáticas ou ser sequestrado para depósitos no organismo. Somente um medicamento na forma livre é distribuído para os tecidos, e, na distribuição, é importante levar em conta a água corporal que representa de 50 a 70% do peso do organismo sendo dividida da seguinte forma: plasma sanguíneo (4,5%), líquido intersticial (16%), linfa (1-2%), líquido intracelular (30-40%) e líquido transcelular 2,5%. No interior de cada um desses compartimentos aquosos as moléculas dos medicamentos se encontram em solução livre ou na forma ligada, e na forma molecular ou iônica de acordo com o pH do compartimento. Portanto, o equilíbrio na distribuição entre os vários compartimentos depende da capacidade

do fármaco em atravessar as barreiras teciduais, do seu pKa, do pH do meio, se está na forma ligada ou livre e da lipo ou hidrossolubilidade (FLORIO; SOUSA, 2011).

A detecção do diclofenaco sódico no plasma ocorreu a partir dos 60 dias de tratamento e a do cetorolaco de trometamina somente aos 90 dias de tratamento. Isto pode ter ocorrido porque o cetorolaco de trometamina 0,5% e o diclofenaco sódico 0,1% apresentam diferenças quanto à concentração, estrutura, massa molecular, lipossolubilidade e pKa. O pKa do diclofenaco sódico é de 4,18, enquanto que o pKa do cetorolaco de trometamina é de 3,5 (ABIB, 2008). Para que ocorra a absorção do fármaco na superfície ocular, deve ser mantido um pH onde haja equilíbrio entre as formas ionizada e não ionizada do medicamento. O pH fisiológico da lágrima varia de 7,2 a 7,5 nos animais de laboratório, entretanto no coelho é 8,2 (MILICHAMP, 1999). O pH alcalino do filme lacrimal do coelho favorece a absorção do diclofenaco sódico, pois seu pKa é maior em comparação com o cetorolaco de trometamina.

Outro ponto importante na compreensão da farmacocinética de um medicamento é o tempo necessário para alcançar o equilíbrio. Quando os fármacos são administrados prolongadamente, eles podem se acumular no organismo até que a quantidade administrada em um determinado período de tempo seja igual à quantidade eliminada no mesmo período. Quando isso ocorre, a concentração plasmática alcançará um platô e também o estado de equilíbrio (*steady state*). O tempo necessário para alcançar o *steady state* é determinada pela meia-vida do medicamento. Na maioria das situações clínicas assume-se que o *steady state* leve de três a cinco meias-vidas para ser alcançado (FLORIO; SOUSA, 2011). Como a meia vida do diclofenaco sódico é de 1,4 horas (LILL et al., 2000) e a do cetorolaco de trometamina de 5,4 horas (GILLIS; BROGDEN, 1997), justifica que, neste estudo, o diclofenaco sódico tenha sido detectado no plasma aos 60 dias de tratamento e o cetorolaco somente aos 90 dias.

Quanto aos efeitos adversos de AINEs, parecem ser espécie específicos e dependem também de outros fatores como idade, peso e predisposição individual (GIULIANO, 2004; KIM et al, 2010). Assim como em pediatria humana, em medicina veterinária pacientes com portes e pesos diferentes recebem a mesma dose do fármaco quando uma gota de colírio é instilada, o que pode predispor a reações adversas (ISENBERG; EVERETT, 1984; BOWMAN et al., 2004; LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010). Os coelhos utilizados neste estudo eram fêmeas, jovens e chegaram ao final dos três meses de tratamento com um peso médio de 4kg. Apesar de ter ocorrido absorção sistêmica dos fármacos, o tratamento com colírios de CT e DS três vezes ao dia, por 90 dias, não causou alterações clínicas. O consumo de água e de ração não apresentou qualquer diferença entre os grupos ao longo dos momentos avaliados ($p_{\text{Interação}} > 0,05$), sendo que não houve alteração de consumo ao longo dos momentos ($p_{\text{Momento}} > 0,05$) e o padrão de consumo por grupo foi em média estatisticamente igual ($p_{\text{Grupo}} > 0,05$) (**Tabela 2**). O ganho de peso dos animais não diferiu estatisticamente entre os grupos ($p = 0,291$), apenas o peso teve um aumento médio do início para o fim ($p < 0,001$), mas independente do grupo (**Figura 1**). De acordo com Jepson (2010), o controle do peso em coelhos é um dos principais parâmetros de avaliação clínica.

Quanto aos resultados das necropsias, em nenhum dos grupos foram encontradas alterações macro e microscópicas na mucosa gástrica, no fígado e nos rins. Apenas o coelho GCT16, que teve morte súbita aos 45 dias de tratamento, apresentou alterações inespecíficas, como edema pulmonar e congestão hepática. Neste indivíduo não havia indícios de doença parasitária, gastrite, alterações renais ou cardíacas. A causa da morte foi inconclusiva, tendo em vista que o GCT16 estava ganhando peso em ritmo semelhante aos outros animais e não apresentou alterações ao exame clínico semanal. Sabe-se que reações anafiláticas e anafilactóides também podem ocorrer com o uso de AINEs, inclusive pela via tópica ocular, pois a absorção ocorre pela mucosa conjuntival e nasal (ISENBERG; EVERETT, 1984;

BOWMAN et al., 2004; GIULIANO, 2004; LEVY; ZADOK, 2004; VITA SOBRINHO; BATISTUZZO, 2010; KIM et al, 2010). Há relatos na literatura de exacerbação de asma brônquica em pessoas adultas após o uso tópico ocular de diclofenaco (SHARIR, 1997) e cetorolaco (SITENGA et al., 1996). A broncoconstrição desencadeada por fármacos AINEs pode ser grave, e muitas vezes fatal em indivíduos sensíveis (BELTON, 2009; BORGES et al., 2010). Isto ocorre porque os AINEs podem desencadear reações de hipersensibilidade alérgicas imediatas ou tardias e também reações não alérgicas (BORGES et al., 2010). Entretanto, a hipótese de que o GCT16 possa ter sofrido uma hipersensibilidade tardia ao cetorolaco de trometamina não pôde ser confirmada. Especialistas em cunicultura afirmam que muitos criadores observam a morte de coelhos com mais de 60 dias de idade, sem quaisquer sinais clínicos, sugerindo morte súbita (MACHADO, 2010). A mortalidade de lãparos nos primeiros dias de vida pode chegar até 20%, entretanto, casos de morte súbita em matrizes são incomuns e normalmente não são notificadas, o que justifica a falta de relatos indicando o percentual destas perdas (MACHADO, 2010). Sendo assim, não foi possível estabelecer a importância da morte súbita do GCT16 no presente estudo.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a absorção de cetorolaco de trometamina 0,5% e de diclofenaco sódico 0,1% ocorre pela mucosa conjuntival e nasal de coelhos. A metodologia analítica SPE-MS foi eficaz na identificação dos respectivos AINEs no plasma de coelhos, sendo que, em até 30 dias de tratamento, a concentração plasmática de diclofenaco sódico é insignificante, já o cetorolaco de trometamina não apresentou concentrações plasmáticas detectáveis até os 60 dias. Não foram observados efeitos adversos locais e sistêmicos. Este estudo demonstra que o uso tópico ocular de cetorolaco de trometamina 0,5% e de diclofenaco sódico 0,1%, três vezes ao dia, por 90 dias, é bem

tolerado em coelhos hípidos da raça Nova Zelândia. Sugerimos monitoramento laboratorial no caso nefropatas e hepatopatas que necessitem tratamento oftálmico com esses fármacos por mais de 30 dias.

COMITÊ DE ÉTICA

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, processo número 14-147/2014.

REFERÊNCIAS

- ABIB, F. C. **Terapêutica Farmacológica em Oftalmologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2008, p.384-386.
- ARAGONA, P. et al. The effects of the topical administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on corneal epithelium and corneal sensitivity in normal subjects. **Eye**, v. 14, n. 2, p. 206-210, 2000.
- ASAI, T. et al. Three cases of corneal melting after instillation of a new nonsteroidal anti-inflammatory drug. **Cornea**, v. 25, n. 10, p. 1267-1268, 2006.
- BOWMAN, R. J. et al. Ocular and systemic side effects of brimonidine 0.2% eye drops (Alphagan) in children. **Eye**, v. 18, n. 1, p. 24, 2004.
- EMAMI, J. et al A rapid and sensitive modified HPLC method for determination of diclofenac in human plasma and its application in pharmacokinetic studies. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 132-138, 2007
- ESTEROIDEOS, R. Corneal melting and topical nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**. v. 84, p. 311-314, 2009.

- FLÓRIO, J.C.; SOUSA, A.B. Farmacocinética. In: SPINOSA, H.S. et al. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 5 ed, cap. 4, p. 33-35.
- GILLS, J. P. Voltaren associated with medication keratitis. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 20, n. 1, p. 110, 1994.
- GILLIS, J. C.; BROGDEN, R. N. Ketorolac. **Drugs**, v. 53, n. 1, p. 139-188, 1997.
- GIULIANO, E. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 707-723, 2004.
- GUIDERA, A. C. et al. Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Ophthalmology**, v. 108, n. 5, p. 936-944, 2001.
- HSU, K. The Ocular and Systemic Adverse Effects of Topical 0.1% Diclofenac in Healthy Cats. 2013. **Dissertação de Mestrado**.
<https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/7439/Hsu_Kimberly_201308_MSc.pdf?sequence>. Acesso em: 10 out. 2013.
- ISENBERG, S.; EVERETT, S. Cardiovascular effects of mydriatics in low-birth-weight infants. **The Journal of pediatrics**, v. 105, n. 1, p. 111, 1984.
- JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
- JEPSON, L. **Clínica de animais exóticos**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, cap. 2, p. 45
- JERICÓ, M.M.; ANDRADE, S.F. Antiinflamatórios. In: ANDRADE, S.F. Manual de Terapêutica Veterinária. São Paulo: Roca, 2008. 3 ed. cap. 7. p. 121-132.
- KATZUNG, B. G. Fármacos Anti-Inflamatórios Não-Esteróides. **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 482.

KIM, S. J. et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 55, n. 2, p. 108-33, 2010.

KIRKWOOD, B. R.; STERNE, J. A. C. **Essential Medical Statistics**. Massachusetts: Blackwell, 2006. 2 ed. p. 502.

LANÇAS, F. M. et al. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LILL, J.S.; O’SULLIVAN, T.,BAUER, L.A.; HORN, J.H.; CARITHERS, R.; STRANDNESS, D.E.; THAKKER, K. Pharmacokinetics of diclofenac sodium in chronic active hepatitis and alcoholic cirrhosis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.40, n.3.p. 250-257, 2000.

LEVY, Y.; ZADOK, D. Systemic side effects of ophthalmic drops. **Clinical pediatrics**, v. 43, n. 1, p. 99, 2004.

MACHADO, L. C. et al. **Nota técnica**: mortalidade de láparos em cunicultura. Bambuí: Associação Científica Brasileira de Cunicultura, 2010. Disponível em: <http://www.acbc.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=204&Itemid=252>.

Acesso em: 2 maio 2016.

MILICHAMP, N.J. Toxicidade in specific ocular tissues. In: CHIOU, G.C.Y. **Ophthalmic Toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis, 1999. 2 ed. Cap. 3. P. 92.

NETER, J. et al. **Applied Linear Statistical Models**. Illinois: Richard D. Irwing. 1996. 4 ed. p.1408.

SHARIR, M. Exacerbation of asthma by topical diclofenac. **Archives of ophthalmology**, v. 115, n. 2, p. 294, 1997.

SHER, N.A. et al. Role of topical corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory drugs in the etiology of stromal infiltrates after excimer photorefractive keratectomy. **Journal of refractive and corneal surgery**, v. 10, n. 5, p. 587-588, 1993.

- SHIMAZAKI, J. et al. Persistent epithelial defect following penetrating keratoplasty: an adverse effect of diclofenac eyedrops. **Cornea**, v. 14, n. 6, p. 623-627, 1995.
- SITENGA, G. L. et al. Asthma caused by topical application of ketorolac. **Ophthalmology**, v. 103, n. 6, p. 890-892, 1996.
- SPARKES, A. H. et al. ISFM and AAFP consensus guidelines: long-term use of NSAIDs in cats. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 12, n. 7, p. 521-538, 2010.
- SRINIVASAN, R. Topical ketorolac tromethamine 0.5% versus diclofenac sodium 0.1% to inhibit miosis during cataract surgery. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 28, n. 3, p. 517-520, 2002.
- SITENGA G.L. et al. Asthma caused by topical application of ketorolac. **Ophthalmology**, v.103, p. 890-892, 1996.
- SUENAMI, K. et al. Rapid and simultaneous determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by LC–MS with solid-phase extraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.384, n.7, p.1501-1505, 2006.
- TASAKA A. C. Antiinflamatórios não esteroidais. In SPINOSA H.S. et al **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 5 ed. cap. 21. p. 245-260.
- VITA SOBRINHO, J.B.; BATISTUZZO, J.A.O. Iatrogenia ocular. In: NAKANAMI, C.R. et al. **Oftalmopediatria**. São Paulo: Roca, 2010, cap. 48, P. 587-8.
- ZANETTI, F.R. et al. Effect of preoperative use of topical prednisolone acetate, ketorolac tromethamine, nepafenac and placebo, on the maintenance of intraoperative mydriasis during cataract surgery: A randomized trial. **Indian journal of ophthalmology**, v. 60, n. 4, p. 277, 2012.

Tabela 1: Presença dos íons no plasma detectados por SPE/MS que comprovam a absorção sistêmica dos fármacos de acordo com o tempo de tratamento:

Tempo de tratamento	Grupo Cetorolaco	Grupo Diclofenaco
30 dias	Ausência de íons	Ausência de íons
60 dias	Ausência de íons	Íon 318 (+)
90 dias	Íon 256 (+)	Íon 318 (+)

Tabela 2. Descrição do consumo de água e ração e do peso dos animais segundo os grupos e momentos de avaliação. Ganho de peso dos animais segundo os grupos e resultado das análises comparativas.

Variável/Momento	Grupo			P Grupo	P Momento	P Interação
	Controle (N = 6)	Diclofenaco (N = 6)	Cetorolaco (N = 5)			
Consumo de água (mL)*				0,506	0,479	0,434
30 dias	348,5 ± 49,6	330,5 ± 69,5	333,8 ± 51,4			
60 dias	387,3 ± 50,7	435,8 ± 35,5	384,6 ± 69,3			
90 dias	375,7 ± 46,7	415,2 ± 36,1	407 ± 31,7			
Consumo de ração (g)*				0,097	0,174	0,886
30 dias	187,3 ± 44,2	222,2 ± 34,4	209,2 ± 43			
60 dias	197,5 ± 34,8	209,5 ± 5,1	197,2 ± 26,4			
90 dias	180,5 ± 38	231,2 ± 31,6	222 ± 10,2			
Peso (Kg)				0,459	<0,001	0,055
Inicial	3,1 ± 0,5	2,8 ± 0,3	2,6 ± 0,2			
Final	4,7 ± 0,5	4,7 ± 0,4	4,6 ± 0,3			
Ganho de peso	1,6 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,291		

Dados expressos em média ± dp; * Resultados ajustados pelo peso inicial

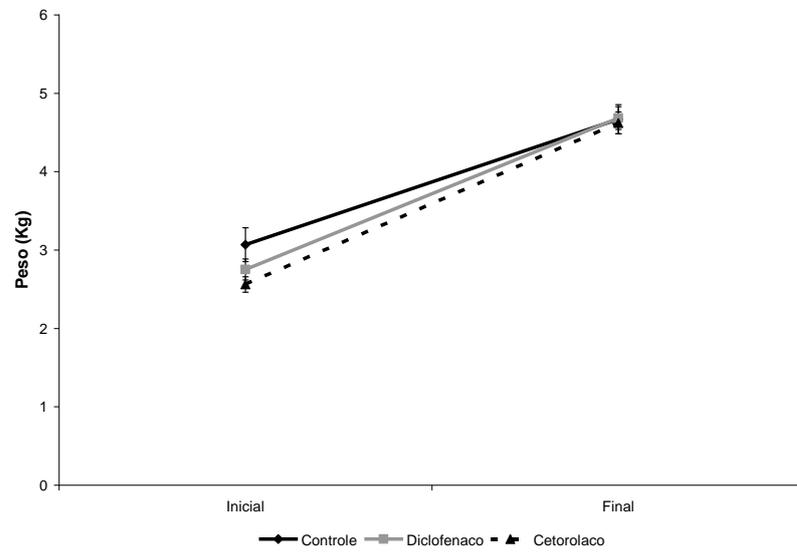


Figura 1: Gráfico dos perfis médios e respectivos desvios padrões do peso dos animais segundo os grupos. Os animais tiveram um ganho linear de peso independente do grupo.

CAPÍTULO V

ARTIGO 2:

Avaliação ultraestrutural do epitélio corneanos de coelhos tratados por 90 dias com colírios de cetorolaco de trometamina diclofenaco sódico sem conservantes

Ultrastructural evaluation of corneal epithelium of rabbits treated for 90 days with drops of ketorolac tromethamine diclofenac sodium without preservatives

Pereira, FQP; Macedo, M.B.B.; Silva, C, T.; Santos, B.; Faganello, C.S; Hunning, P.; Mello, F.B.; Pigatto, J.T. Mello, J.R.B.

Manuscrito a ser submetido para a revista *Investigative Ophthalmology & Visual Science*

OBJETIVO Avaliar e comparar, através de microscopia eletrônica de varredura, os potenciais efeitos epiteliotóxicos dos colírios contendo diclofenaco sódico (DS) 0,1% e cetorolaco de trometamina (CT) 0,5%, livres de conservantes, sobre a superfície da córnea de coelhos hípidos da raça Nova Zelândia tratados três vezes ao dia por 90 dias.

MÉTODOS: 17 Coelhos da raça Nova Zelândia, sem alterações oculares, foram divididos em três grupos: Grupo Controle (GC) com n=6 (12 córneas), Grupo Diclofenaco Sódico (GDS) com n=6 (12 córneas) e Grupo Cetrorolaco de Trometamia (GCT) com n=5 (10 córneas). Ambos os olhos foram tratados três vezes ao dia por 90 dias com colírio de CT 0,5%, DS 0,1% e solução fisiológica (NaCl 0,9%) de acordo com o grupo. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados para que o epitélio da córnea fosse analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram realizadas eletromicrografias da área central do epitélio de cada córnea e, ao aumento de 500x foram visibilizadas em média 70 células epiteliais por campo. Em cada campo foi observado: o número de células claras, cinzas, escuras, o número de criptas e o grau de perda formato hexagonal das células.

RESULTADOS: Com exceção da contagem de criptas, todos os demais parâmetros avaliados (perda do formato hexagonal e número de células claras e cinzas e escuras) apresentaram diferenças entre os grupos estatisticamente significativas ($p < 0,05$). O número de células escuras foi estatisticamente maior no GCT que nos demais grupos ($p < 0,05$), o número de células cinzas foi estatisticamente maior no GDS do que no GC ($p = 0,003$). Observou-se que quanto maior o número de células escuras, menor o número de células claras ($r = -0,577$ e $p < 0,001$) e a perda de formato apresentou correlação direta com o número de células escuras ($r = 0,524$ e $p = 0,002$).

CONCLUSÕES: Após noventa dias de tratamento com colírios de CT e DS sem conservantes, foram observadas alterações no epitélio da córnea hígida de coelhos. Ambos os fármacos causaram alterações no epitélio corneano, entretanto, devido à maior presença de células escuras no GCT podemos afirmar que o CT 0,5% causou maior toxicidade ao epitélio da córnea do que o DS 0,1%.

INTRODUÇÃO

Formulações oftálmicas com AINEs são consideradas alternativas mais seguras para tratamentos prolongados do que aquelas com corticosteroides, a fim de evitar efeitos adversos como a elevação da pressão intra-ocular, formação de catarata, infecções secundárias na superfície ocular e destruição do colágeno da córnea (STROOBANTS, et al., 2000; GUIDERA et al., 2001; KIM et al., 2010). Os AINEs também são muito utilizados em pacientes diabéticos, na prevenção de edema macular cistóide após cirurgia de catarata, cujo tratamento com corticosteroides tópicos interferem na estabilização da glicemia (IRIT 2011; ELSAWY et al., 2013). Entretanto, casos graves de derretimento do colágeno da córnea ocorreram na década de 1990 após o uso de uma forma genérica de solução oftálmica de diclofenaco sódico 0,1% (FLACH, 2001). Apesar da preocupação com a possibilidade de derretimento do colágeno da córnea, poucos estudos foram realizados correlacionando esta adversidade com os AINEs mais recentes, particularmente quando esses fármacos são usados em médio e longo prazos. Além disso, não foi possível concluir se os casos de derretimento foram realmente devido ao uso do AINE tópico, pois todos os relatórios clínicos mostravam co-morbidades e o uso de medicações tópicas concomitantes, além da presença de conservantes nas formulações (SINGER et al., 2012). Como opção para o tratamento da dor em abrasões corneais, preconiza-se a aplicação tópica de anti-inflamatórios não esteróides (AINES), que promovem algum grau de analgesia. Não obstante, AINES utilizados como analgésicos nas ceratites ulcerativas podem retardar a reparação e potencializar a degradação do estroma corneal (SZUCS, et al., 2000; ALBERTI et al., 2001).

O ceterolaco de trometamina é um ácido pirolizado, estruturalmente derivado da indometacina. (GILLIS; BROGDEN, 1997; KUMPULAINEN et al., 2008). Formulações oftálmicas de ceterolaco de trometamina 0,5% atualmente disponíveis no mercado são os colírios Acular[®] Allergan e Cetrolac[®], Genon. No colírio da marca Acular[®] Allergan, cada mL (35 gotas) contém: 5,0mg de ceterolaco de trometamina e veículo composto de cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, octoxinol, cloreto de sódio, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio para ajuste de pH e água purificada (ACULAR[®], 2013). O diclofenaco sódico é um sal

derivado da estrutura do ácido 2-aminofenilacético. É um AINE de ação dual, por possuir alta potência anti-inflamatória e analgésica (MANCA et al., 2005). O diclofenaco sódico está disponível na forma de colírio a 0,1% e as principais apresentações comerciais são o Voltaren® Novartis e o Still® Allergan. Cada mL do colírio Still® contém 1,0 mg de diclofenaco sódico (0,036 mg/gota) e o veículo é constituído por: ácido bórico, trometamina, óleo de rícino, edetato dissódico, sulfito de sódio, digluconato de clorexidina e água purificada (STILL®, 2013).

O epitélio da córnea é sensível a diversos medicamentos de uso tópico, sendo que, a dose, o tempo de tratamento e os fatores predisponentes individuais interferem no potencial da toxicidade epitelial (GILLS, 1994; SHIMAZAKI, 1995, AYAKI et al., 2010). Alguns fármacos tópicos podem acentuar o fenômeno de descamação das células, aumentar o número de microprojeções e o número de células escuras e criptas, além de causar modificações nas junções intercelulares, com aumento do espaço entre células adjacentes e perda do formato hexagonal (STROOBANTS, et al., 2000; FERRAZ, et al., 2003). Stroobants e colaboradores (2000) avaliaram o dano epitelial na córnea de coelhos após sete dias de tratamento com seis tipos de AINEs de uso tópico ocular. Concluiu-se que grande parte do dano epitelial foi devido ao tipo de conservante utilizado, deixando dúvidas sobre o real envolvimento de cada AINE nas alterações encontradas no epitélio corneano. Ayaki e colaboradores (2010) confirmaram que os AINEs causam toxicidade no epitélio da córnea mesmo na ausência de conservantes. Entretanto foi utilizada metodologia *in vitro* e as células foram expostas aos fármacos por apenas 48h (AYAKI, et al 2010). Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura, as alterações no epitélio da córnea de coelhos após 90 dias de tratamento com colírios de cetorolaco de trometamina 0,5% e diclofenaco sódico 0,1% sem conservantes.

MÉTODOS

Animais experimentais

Após a realização do teste da lágrima de Schirmer, do teste da lissamina verde, do teste da fluoresceína, da biomicroscopia com lâmpada de fenda (Kowa® SL-15 Slit-lamp Biomicroscope, Japão) e da tonometria de aplanção (TonoPen® AVIA, Reichert Technologies, EUA.), foram selecionados 17 coelhos hípidos da linhagem Nova Zelândia, albinos, fêmeas, com 90 dias de idade, pesando entre 2 e 2,5kg, hípidos, com padrão sanitário

convencional . Os animais foram mantidos no biotério do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS em condição constante de umidade (50-5%UR), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 8h30min às 20h30min) em gaiolas individuais de aço inoxidável, alimentados com ração padronizada (Nuvilab[®]) e água *ad libitum*. Após o período de adaptação de sete dias foram separados em três grupos: Controle (GC) com n=12 córneas, Diclofenaco Sódico (GDS) com n=12 córneas e Cetorolaco de Trometamina (GCT) com n=10 córneas. O alojamento, manejo e eutanásia dos animais seguiram a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e o Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009, respeitando-se também os princípios éticos na pesquisa experimental determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as diretrizes para prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013). O estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética na Utilização dos Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), processo número 14-147/2014.

Tratamento

Os três grupos (GC, GDS, GCT) foram avaliados por 90 dias e ambos os olhos de todos os coelhos foram tratados três vezes ao dia conforme o grupo. Os colírios de DS 0,1% e de CT 0,5% foram manipulados sem conservantes (Ophthalmos ind. com. produtos farmacêuticos Ltda, Brasil). O GC recebeu colírio de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Semanalmente a superfície ocular de todos os animais era examinada somente com o biomicroscópio com lâmpada de fenda, evitando assim uma interferência na avaliação ultraestrutural do epitélio corneano no término dos tratamentos.

Obtenção e preparação das amostras

Após o período de tratamento estipulado em 90 dias, os coelhos foram eutanasiados e as amostras preparadas conforme descrito por Morán (2006): imediatamente foi instilada solução fixadora de Karnovsky mol/L^{-1} na superfície corneana, em seguida os bulbos oculares foram enucleados subconjuntivalmente e submersos na solução fixadora de Karnovsky mol/L^{-1} por 15 min, desta forma todas as camadas da córnea entraram em contato com o fixador. As córneas foram removidas por peritomia límbica em 360° , formando um anel córneo-escleral com lâmina de bisturi nº 15 à aproximadamente 2 mm do limbo corneano. As amostras foram

mantidas na solução de Karnovsky mol/L^{-1} , sob refrigeração, por 5 dias, a fim de manter a superfície corneana completamente lisa. Posteriormente à conservação, as amostras foram submetidas à desidratação em séries crescentes de álcool etílico (50, 60, 70, 80, 90 e 100%), durante 15 minutos respectivamente. Na sequência, as amostras foram dessecadas, substituindo gradativamente o álcool do meio por hexametildisilazano para evitar a contração das amostras durante a secagem.

Análise ultra-estrutural do epitélio corneano

No Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, as amostras foram acondicionadas em porta-espécime, com a camada epitelial para cima, com fita condutiva de cobre e cola de carbono, sendo metalizadas com uma camada de ouro e paládio de 35nm de espessura. Ato contínuo, cada amostra foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL, Tóquio, Japão). Foram realizadas no mínimo três eletromicrografias da área central do epitélio de cada córnea em diferentes aumentos. Ao aumento de 500x foram analisadas 70 células da zona central do epitélio de cada córnea, de acordo com o seguinte critério: número de células escuras, cinzas e claras, número de criptas e a perda do formato hexagonal das células (**Figura 1**). A perda do formato hexagonal das células foi graduada conforme um sistema empírico de escore de zero a cinco. Onde zero significava que todas as células presentes no campo apresentavam um perfeito formato hexagonal, e o escore cinco representava a perda total do formato hexagonal. As amostras foram analisadas ao acaso, desta forma não era possível que o examinador identificasse a qual grupo a amostra pertencia.

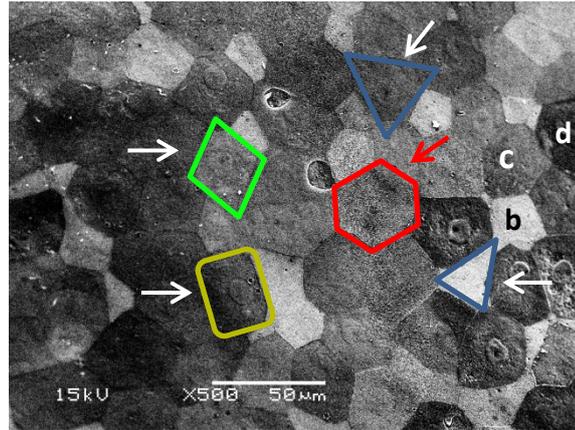


Figura 1: Exemplo de eletromicrografia da zona central do epitélio da córnea de coelho utilizada para realização da contagem celular e da avaliação do grau de perda do formato hexagonal. Amostra caracterizada como escore III de perda de formato hexagonal, com 18 células claras (**b**), 22 células cinzas (**g**) e 30 células escuras (**b**). Seta vermelha: célula cinza em perfeito formato hexagonal. Setas brancas: células apresentando perda do formato hexagonal.

Análise estatística

O número de células claras, escuras e cinzas e a perda de formato foram descritos segundo os grupos com o uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas entre os grupos com uso de testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas de Dunn quando necessárias (NETER, et. al., 1996). Foram calculadas as correlações de Spearman (KIRKWOOD; STERNE, 2006) entre o número de células escuras com a contagem das demais células e com a perda de formato, tanto no total de córneas avaliadas como separadamente por grupos. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de sua ampla utilização, os colírios contendo AINEs podem causar importantes reações adversas. O uso continuado de AINEs tópicos pode resultar em diminuição da

sensibilidade corneana (SUN; GIMBEL; 1997), defeitos epiteliais persistentes, ceratite punctata superficial (GILLS, 1994; SHIMAZAKI et al., 1995), infiltrados estromais (SHER, et al 1993), infiltrados subepiteliais (PROBST; MACHAT, 1996), ulceração do estroma corneano (LIN et al; 2000), destruição do colágeno da córnea (FLACH, 2001; ASAI et al., 2006; ESTEROIDEOS, 2009) e perfuração da córnea (GUIDERA et al., 2001; DEMIREL, SARAC, 2012). No presente estudo, durante os 90 dias de tratamento com os colírios de cetorolaco de trometamina 0,5% e com diclofenaco sódico 0.1%, nenhum animal apresentou alterações que pudessem ser identificadas à biomicroscopia com lâmpada de fenda. Os animais se mantiveram confortáveis, sem blefarospasmo, secreção ou hiperemia e as córneas se mantiveram transparentes.

Para uma análise mais detalhada do epitélio corneano optou-se pela MEV, que é um dos procedimentos metodológicos de investigação mais utilizados para observar as características morfológicas quantitativas e qualitativas das células mais superficiais do epitélio da córnea (BURSTEIN; KLYCE, 1977; THERMES et al., 1991; PAWLEY, 1997; FERRAZ, et al., 2003; MORÁN, 2006). O padrão do epitélio da córnea dos animais do GC, apresentou-se de acordo com a literatura. Através da MEV observou-se que o epitélio corneano hígido do coelho é constituído em grande parte por células claras, moderado número de células cinzas e poucas células escuras (Figura 2), cuja superfície está coberta por numerosas microprojeções citoplasmáticas na forma de microvilosidades e criptas. O tamanho e a forma das células são variados, entretanto há predominância de células pequenas de formato hexagonal (PFISTER, 1973; DOUGHTY, 1990; DOUGHTY, 1991, STROOBANTS et al., 2000 ; FERRAZ et al., 2003). Estas variações no tamanho e no formato celular já haviam sido relatadas e parecem estar relacionadas ao fenômeno da constante renovação epitelial (KENYON, 1979; FERRAZ et al, 2003; MORAN, 2006).

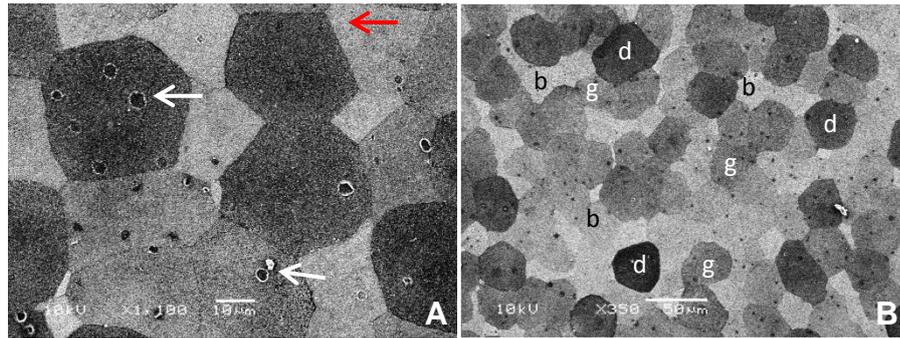


Figura 2: Epitélio corneano hígido de coelho (GC). **Figura 2A:** Célula escura em perfeito formato hexagonal (seta vermelha) e presença de criptas (seta branca). **Figura 2B:** Observa-se células claras (b), cinzas (g), além de pequeno número de células escuras (d).

A origem das células claras, cinzas e escuras ainda não foi completamente elucidada. Segundo Pfister (1973) e Thoft; Friend (1983), os tipos celulares corresponderiam a diferentes estágios de maturação celular, onde as células claras seriam as mais jovens. Entretanto, alguns autores discordam desta teoria, pois observaram que a descamação celular não ocorre em apenas um tipo celular e que há grande heterogeneidade nas células claras. Sendo assim acredita-se que as células claras, cinzas e escuras são fenótipos diferentes que amadurecem de forma paralela na superfície ocular (DOUGHTY, 1996; MORAN, 2006).

Em geral postula-se que a luminosidade celular (clara, cinza ou escura), depende da densidade e da morfologia longitudinal das microvilosidades presentes no epitélio. Sendo assim, células claras possuem mais microvilosidades e as escuras menos (STROOBANTS et al., 2000; MORAN, 2006). Sobre a função das criptas e das microvilosidades presentes nas células epiteliais, alguns autores acreditam que estas estruturas facilitam a absorção de oxigênio e auxiliam a movimentação de partículas através da membrana celular (BEUERMAN; PEDROZA, 1996; COLLIN; COLLIN, 2005).

No GCT houve um importante acréscimo de células escuras do que nos demais grupos ($p < 0,05$), diminuição de células claras e alto grau de perda do formato hexagonal. Resultado semelhante foi verificado por Stroobants et al. (2000). Comparando com o GC, o GDS apresentou um número de células cinzas estatisticamente maior, mas não diferiu quanto ao número de células escuras. No total das córneas avaliadas, a correlação entre o número de células escuras com o número de células claras foi inversa, ou seja, quanto maior o número de células escuras, menor o número de células claras ($r = -0,577$ e $p < 0,001$) e a perda de formato apresentou correlação direta com o número de células escuras ($r = 0,524$ e $p = 0,002$), conforme tabela 1.

Tabela 1. Descrição da contagem celular e do grau de perda do formato hexagonal, segundo os grupos e comparações entre os grupos:

Variável/Momento	Grupo		
	Controle ➤ (N = 11)	Diclofenaco (N = 12)	Cetorolaco (N = 10)
Escuras			
média ± dp	21,2 ± 6	24,2 ± 6,3*	28,6 ± 3,9*
mediana (mín. - máx.)	21 (14 - 34)	22,5 (15 - 37)	27,5 (23 - 36)
Cinzas			
média ± dp	25,5 ± 4,8	32,1 ± 6,8*	29,4 ± 3,5
mediana (mín. - máx.)	25 (14 - 32)	34 (20 - 42)	30,5 (22 - 34)
Claras			
média ± dp	23,5 ± 4,1	13,8 ± 3,8*	12 ± 3,6*
mediana (mín. - máx.)	23 (19 - 32)	13,5 (8 - 22)	12,5 (6 - 16)
Criptas			
média ± dp	15,9 ± 12,4	31,4 ± 21,5	21 ± 10,7
mediana (mín. - máx.)	9 (3 - 38)	26 (5 - 68)	18 (5 - 36)
Perda de formato			
média ± dp	1,6 ± 0,7	2,8 ± 1,1*	3,7 ± 1,3*
mediana (mín. - máx.)	2 (1 - 3)	2,5 (1 - 4)	4 (2 - 5)

Teste Kruskal-Wallis

➤ N=11 devido à perda de uma córnea na preparação.

* Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

O padrão celular foi alterado por ambos AINEs, sendo que o DS (Figura 2) causou maior aumento de células cinzas e o CT (Figura 3) de células escuras. A correlação positiva entre perda de formato hexagonal e aumento de número de células escuras está de acordo com os resultados obtidos por Stroombands et al. (2000). Durante a renovação celular, As células mais velhas descamam e perdem a habilidade de prender o filme lacrimal, o que contribui para que se observem células de diferentes características inclusive no epitélio hígido. Entretanto, com a descamação celular exagerada, a função de barreira do epitélio pode estar comprometida, permitindo a passagem de substâncias do meio externo para o estroma, resultando em alterações estromais (FERRAZ et al., 2003). Ferraz et al. (2003) relacionou a maior presença de células escuras com um maior grau de exfoliação celular.

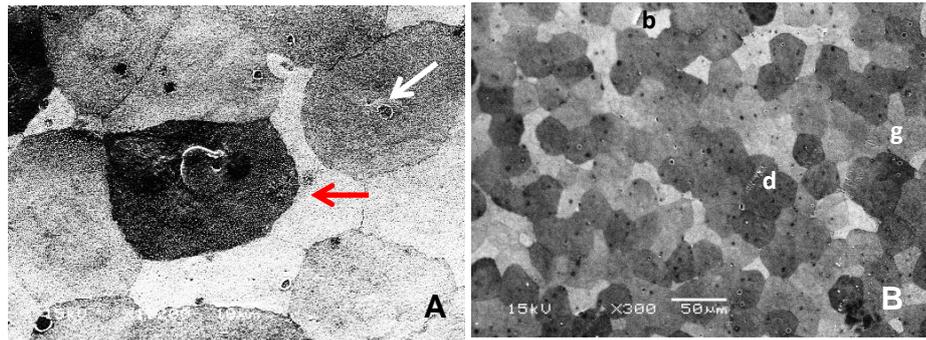


Figura 3: Epitélio corneano de coelho do grupo Diclofenaco. **Figura 3A:** Célula escura com perda grau 3 do formato hexagonal (seta vermelha) e presença de criptas (seta branca). **Figura 3B:** Observa-se que há aumento do número de células cinzas (g) e escuras (d) e diminuição do número de células claras (b) em comparação com o grupo Controle.

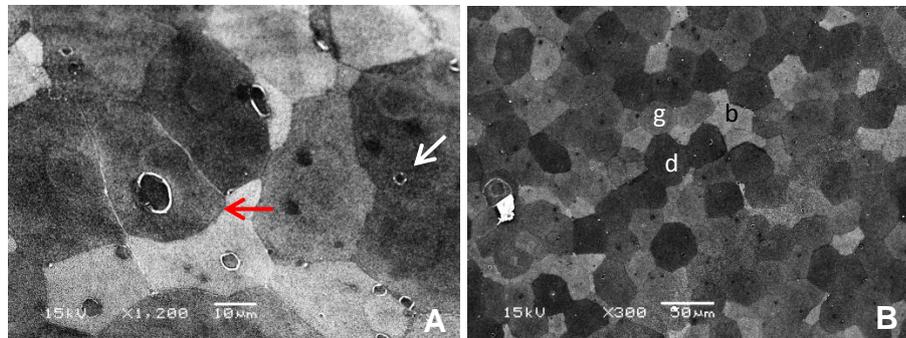


Figura 4: Epitélio corneano de coelho do grupo Ceterolaco. **Figura 4A:** Célula escura com perda grau 4 do formato hexagonal (seta vermelha) e presença de criptas (seta branca). **Figura 4B:** Observa-se que há aumento do número de células cinzas (g) e escuras (d) e diminuição do número de células claras (b) em comparação com o grupo Controle.

Waterbury, Kunysz e Beurman (1987) e Cohen et al. (1995), concluíram que o ceterolaco de trometamina, acrescido do conservante cloreto de benzalcônio, pode retardar a regeneração do epitélio corneal. Os conservantes contidos nos colírios são reconhecidos como causadores de danos na superfície epitelial da córnea. O cloreto de benzalcônio modifica moderadamente o padrão celular do epitélio corneano, já o edetato dissódico causa importantes alterações na membrana celular (STROOBANTS et al., 2000). Como os colírios utilizados no presente trabalho foram manipulados livres de conservantes, podemos afirmar que a perda do formato hexagonal e o aumento do número de células escuras foi devida aos anti-inflamatórios, sendo observadas nos dois grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre GDS e GCT quanto à perda do formato hexagonal. Quanto ao número de criptas, não houve diferença estatística entre os grupos estudados. Stroobants e colaboradores

(2000) identificaram aumento no número de criptas no epitélio da córnea de coelhos tratados com Voltarem[®] colírio, assim como ocorreu com outras apresentações comerciais de diferentes AINEs. Tendo em vista que os conservantes eram diferentes, o autor atribuiu o aumento no número de criptas ao baixo pH dos veículos.

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo nos permite concluir que os AINEs diclofenaco sódico 0,1% e ceterolaco de trometamina 0,5% provocam alterações no epitélio corneano íntegro de coelhos. Devido à maior presença de células escuras no GCT podemos sugerir que o CT 0,5% causou maior toxicidade ao epitélio da córnea do que o DS 0,1%.

REFERÊNCIAS

ACULAR[®]: solução oftálmica de ceterolaco de trometamina 0,5%. Responsável técnico Flávia Regina Pegore. Guarulhos: Allergan, [2013]. **Bula de remédio**. Disponível em <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25278-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25278-1-0].PDF)>. Acesso em: 21 out. 2013.

ALBERTI, M.M.; BOUAT, C.G.; ALLAIRE, C.M.; TRINQUAND, C.J. Combined indomethacin/gentamicin eyedrops to reduce pain after traumatic corneal abrasion. **European journal of ophthalmology**, v. 11, n. 3, p. 233-239, 2001.

APPIOTTI, A.; GUALDI,L.; ALBERTI,M.; GUALDI,M. Comparative study of the analgesic efficacy of flurbiprofen and diclofenac in patients following excimer laser photorefractive keratectomy. **Clinical therapeutics**, v. 20, n. 5, p. 913-920, 1998.

ASAI, T.; NAKAGAMI, T.; HOTTA, Y. Three cases of corneal melting after instillation of a new nonsteroidal anti-inflammatory drug. **Cornea**, v. 25, n. 10, p. 1267-1268, 2006.

ATTAR,M.; SCHIFFMSstrN,R.; BORBRID,L.;FARNES,Q.;WELTY,D. Ocular pharmacokinetics of 0.45% ketorolac tromethamine.**Clinical Ophthalmology**,v.4, p. 1403-1408, 2010.

AYAKI, M.; IWASAWA, A.; SODA, M.; YAGUCHI, S.; KOIDE, R. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneconjunctival cell lines. **Clinical Ophthalmology**, v. 4, p. 1019-1024, 2010.

BURSTEIN, N. L.; KLYCE, S., D. Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 16, n. 10, p. 899-911, 1977.

COHEN, R.; BEUERMAN, R.W.; GEBHARDT, B.M.; BAZAN, N.G. Comparason of the effect of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs with patching on corneal epithelial wound healing. **ARVO Annual Meeting**, Ft. Lauderdale, FL: 1995

DEMIREL, S.; SARAC, O. Late Corneal Perforation With Topical Diclofenac Sodium Use After Radiotherapy. **Eye & Contact Lens**, v. 38, n. 3, p. 197-199, 2012.

DOUGHTY, Michael J. Morphometric analysis of the surface cells of rabbit corneal epithelium by scanning electron microscopy. **American journal of anatomy**, v. 189, n. 4, p. 316-328, 1990.

DOUGHTY, M. J. Scanning electron microscopy study of cell dimensions of rabbit corneal epithelium surface. **Cornea**, v. 10, n. 2, p. 149-155, 1991.

ELSAWY, M.F.; BADAWI, N.; KHAIRY, H. A. Prophylactic postoperative ketorolac improves outcomes in diabetic patients assigned for cataract surgery. **Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)**, v.7, p.1245, 2013.

ESTEROIDEOS, R. Corneal melting and topical nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). **Arch. Soc. Esp. Oftalmol.**, v. 84, p. 311-314, 2009.

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

FERRAZ, L. C.B.; SCHELLINI, S. A.; GREGRIO, E. A. Efeito do colírio de 5-fluorouracil sobre o epitélio corneano íntegro de coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 493-7, 2003.

GILLIS, J. C.; BROGDEN, R. N. Ketorolac: A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in pain management. **Drugs**, v. 53, n. 1, p. 139-188, 1997.

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

IRIT, B. The Effect of Topical Steroids on Blood Glucose Profile in Diabetic Patients. **Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.2, n.2, p.1-3, 2011.

KENYON, K.R. Anatomy and pathology of ocular surface. *International Ophthalmology Clinics*, v.19, p.3-35, 1979.

KIM, S. J.; FLACH, A. J.; JAMPOL, L. M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 55, n. 2, p. 108-33, 2010.

KENYON, K.R. Anatomy and pathology of ocular surface. *International Ophthalmology Clinics*, v.19, p.3-35, 1979.

KIRKWOOD, B. R. and STERNE, J. A. C (2006). **Essential medical statistics**. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. p.502.

KUMPULAINEN, E.; KOKKI, H.; LAISALMI, M.; HEIKKINEN, M.; SAVOLAINEN, J.; RAUTIO, J.; LEHTONEN, M. How readily does ketorolac penetrate cerebrospinal fluid in children? **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 495-501, 2008.

LILL, J.S.; O'SULLIVAN, T.; BAUER, L.A.; HORN, J.H.; CARITHERS, R.; STRANDNESS, D.E.; THAKKER, K. Pharmacokinetics of diclofenac sodium in chronic active hepatitis and alcoholic cirrhosis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.40, n.3, p. 250-257, 2000.

MANCA, M. L.; ZARU, M.; ENNAS, G.; VALENTI, D.; SINICO, C.; LOY, G.; FADDA, A. M. Diclofenac- β -cyclodextrin binary systems: physicochemical characterization and in vitro dissolution and diffusion studies. **Aaps Pharmscitech**, v.6, n.3, p.464-472, 2005.

MORÁN, G. J. . **Estudio de los cambios morfológicos del epitelio corneal en un modelo animal de ojo seco**.2006. Tese (Doutorado em Medicina) - Universitat de Barcelona, Barcelona. 2006. < <http://hdl.handle.net/2445/35179>>. Acesso em: 23 mar. 2010.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J. And WASSERMAN, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1408p.

PAWLEY, J. B. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. **Scanning-New York** , v. 19, p. 324-336, 1997.

PFISTER, R. R. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 12, n. 9, p. 654-668, 1973.

PROBST, V, E.; MACHAT, Jeffery J. Corneal subepithelial infiltrates following photorefractive

STROOBANTS, A.; FABRE, K.; MAUDGAL, P. C. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on the rabbit corneal epithelium studied by scanning electron microscopy. **Bulletin de la Société belge d'ophtalmologie**, v. 276, p. 73-82, 2000.

SHER, N.A.; KRUEGER,R.R.; TEAL,P.; JANS, R.G.; EDMISON,D. Role of topical corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory drugs in the etiology of stromal infiltrates after excimer photorefractive keratectomy. **Journal of refractive and corneal surgery**, v. 10, n. 5, p. 587-588, 1993.

STILL: solução oftálmica de diclofenaco sódico 0,1%. Responsável técnico Flávia Regina Pegore. Guarulhos: Allergan, [2013] Bula de remédio. Disponível em <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25524-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25524-1-0].PDF)>. Acesso em: 21 out. 2013.

SHIMAZAKI, J.; SAITO, H.; YANG, H.Y. Persistent epithelial defect following penetrating keratoplasty: an adverse effect of diclofenac eyedrops. **Cornea**, v. 14, n. 6, p. 623-627, 1995.

SHER, N.A.; KRUEGER,R.R.; TEAL,P.; JANS, R.G.; EDMISON,D. Role of topical corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory drugs in the etiology of stromal infiltrates after excimer photorefractive keratectomy. **Journal of refractive and corneal surgery**, v. 10, n. 5, p. 587-588, 1993.

SUENAMI, K.; LIM, L.W.; TAKEUCHI, T.; SASAJIMA, Y.; SATO, K.; TAKEKOSHI, Y.; KANNO, S. Rapid and simultaneous determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs

in human plasma by LC–MS with solid-phase extraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.384, n.7, p.1501-1505, 2006.

SUN, R.; GIMBEL, H.V. Effects of topical ketorolac and diclofenac on normal corneal sensation. **Journal of refractive surgery**, v. 13, n. 2, p. 158-161, 1996.

SZUCS, P.A.; MASHED, A.H.; ALLEGRA, J.R. et al. Safety and efficacy of diclofenacophthalmic solution in the treatment of corneal abrasions. **Annals of Emergency Medicine**, v.35, n.2, p.131-137, 2000.

THERMES, Florence; MOLON-NOBLOT, S.; GROVE, Jeffrey. Effects of acetylcysteine on rabbit conjunctival and corneal surfaces. A scanning electron microscopy study. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 32, n. 11, p. 2958-2963, 1991.

THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.24 p.1442–1443, 1983.

CONCLUSÕES

Com relação aos objetivos da tese listados no Capítulo I, as seguintes conclusões podem ser feitas:

- a) Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível constatar que o tratamento por 90 dias com os colírios de diclofenaco sódico 0,1% e ceterolaco de trometamina 0,5%, sem conservantes, provocam alterações no epitélio corneano íntegro de coelhos, entretanto, o ceterolaco de trometamina 0,5% parece ser mais tóxico ao epitélio da córnea, tendo em vista que neste grupo havia mais células escuras do que nos outros grupos.
- b) Comprovou-se que ocorreu a absorção sistêmica dos colírios através da identificação dos fármacos no plasma dos coelhos valendo-se da extração em fase sólida e da espectrometria de massas. O diclofenaco sódico 0,1% foi detectado aos 60 e aos 90 dias de tratamento e o ceterolaco de trometamina 0,5% somente aos 90 dias de tratamento. Apesar de ter ocorrido absorção sistêmica dos fármacos, o tratamento com colírios de ceterolaco de trometamina 0,5% e diclofenaco sódico 0,1% três vezes ao dia por 90 dias, não causou alterações clínicas e laboratoriais nos coelhos.
- c) Os achados *post mortem* na mucosa gástrica, no fígado e nos rins de coelhos tratados por 90 dias com colírios de diclofenaco sódico 0,1% e ceterolaco de trometamina 0,5% foram inespecíficos, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos diclofenaco, ceterolaco e controle.

REFERÊNCIAS

ABIB, F. C. **Terapêutica Farmacológica em Oftalmologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2008, p.384-386.

ACULAR® LS: solução oftálmica de cetorolaco de trometamina 0,4% . Responsável técnico Flávia Regina Pegore. Guarulhos: Allergan, [2013]. **Bula de remédio**. Disponível em:<<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B25503-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 21 out. 2013.

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

APPIOTTI, A.; GUALDI,L.; ALBERTI,M.; GUALDI,M. Comparative study of the analgesic efficacy of flurbiprofen and diclofenac in patients following excimer laser photorefractive keratectomy. **Clinical Therapeutics**, v. 20, n. 5, p. 913-920, 1998.

ARAGONA, P.; TRIPODI,G.; SPONELLA,R.; LAGAN,E.; FERRERI,G. The effects of the topical administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on corneal epithelium and corneal sensitivity in normal subjects. **Eye**, v. 14, n. 2, p. 206-210, 2000.

ASAI, T.; NAKAGAMI, T.; HOTTA, Y. Three cases of corneal melting after instillation of a new nonsteroidal anti-inflammatory drug. **Cornea**, v. 25, n. 10, p. 1267-1268, 2006.

ATTAR, M.; SCHIFFMS, N.R.; BORBRID, L.; FARNES, Q.; WELTY, D. Ocular pharmacokinetics of 0.45% ketorolac tromethamine. **Clinical Ophthalmology**,v.4, p. 1403-1408, 2010.

AYAKI, M. IWASAWA, A.; SODA, M.; YAGUCHI, S.; KOIDE, R. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneoconjunctival cell lines. **Clinical Ophthalmology**, v. 4, p. 1019-1024, 2010.

BARROS, P.S.M. Córnea em medicina veterinária. In: BELFORT Jr. & NEWTON KARA-JOSÉ. **Córnea clínica-cirúrgica**. São Paulo: Roca, 1997. cap. 58, p.601-606.

BAHAR, I.; VINKER, S.; KAISERMAN, I. The Effect of Topical Steroids on Blood Glucose Profile in Diabetic Patients. **Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 2, n. 133, p. 2, 2011.

BHATTACHERJEE, P.; PATERSON, C.A.; SPELLMAN, J.M.; GRAFF,G.; YANNI,J.M. Pharmacological Validation of a Feline Model of Steroid-Induced Ocular Hypertension. **Archives of Ophthalmology**, v.17, p.361-364, 1999.

BOOTHE, D.M. Drug therapy in cats: mechanisms and avoidance of adverse drug reactions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 8, p. 1297-1305, 1990.

BOWMAN, R. J.; COPE, J.; NISCHAL, K. K. Ocular and systemic side effects of brimonidine 0.2% eye drops (Alphagan) in children. **Eye**, v. 18, n. 1, p. 24, 2004.

BURSTEIN, N. L. Preservative cytotoxic threshold for benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate in cat and rabbit corneas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 19, n. 3, p. 308-313, 1980.

BURSTEIN, N. L.; KLYCE, S., D. Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 16, n. 10, p. 899-911, 1977.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: therapeutic advances. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448-464, 2004.

CARVALHO, W., A. Analgésicos, Antipiréticos e Antiinflamatórios. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002;431-455.

CARDOSO, M.M.S.C.; CARVALHO, J.C.A.; TAHAMTANI, S.M.M. et al. Diclofenaco por via muscular ou retal associado com baixas doses de morfina subaracnoidea para analgesia pós-operatória em cesarianas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.52, p.666-672, 2002

CARDOSO, E. S.; CANÇADO, R.P.; HEITZ,C. Estudo exploratório descritivo do emprego de coelhos brancos da Nova Zelândia (*Orytolagus cuniculus*) como modelo animal na avaliação dos padrões de crescimento craniofacial. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n. 55, p. 66-71, 2007.

CHANG, S.; LEE, V.H.L. Nasal and conjunctival contributions to the systemic absorption of topical timolol in the pigmented rabbit: implications in the design of strategies to maximize the ratio of ocular to systemic absorption. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 159-169, 1987.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, 1988, p 179 - 243.

COHEN, M.N.; CHRISTIANS, U.; HENTHORN, T.; TRAN,Z.V.; MOLL, V.;ZUK,J.;GALINKIN,J. Pharmacokinetics of single-dose intravenous ketorolac in infants aged 2–11 months. **Anesthesia & Analgesia**, v. 112, n. 3, p. 655-660, 2011.

DEHAR, N.; GUPTA, A.; SINGH, G. Comparative study of the ocular efficacy and safety of diclofenac sodium (0.1%) ophthalmic solution with that of ketorolac tromethamine (0.5%) ophthalmic solution in patients with acute seasonal allergic conjunctivitis. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 2, n. 1, p. 25, 2012.

DEMIREL, S.; SARAC, O. Late Corneal Perforation With Topical Diclofenac Sodium Use After Radiotherapy. **Eye & Contact Lens**, v. 38, n. 3, p. 197-199, 2012.

DONNENFELD, Eric. Current use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of ocular inflammation related to cataract surgery. **European Ophthalmic Rev**, v. 6, n. 3, p. 173-177, 2012.

DOUGHTY, Michael J. Morphometric analysis of the surface cells of rabbit corneal epithelium by scanning electron microscopy. **American Journal of Anatomy**, v. 189, n. 4, p. 316-328, 1990.

ELSAWY, M.F.; BADAWI, N.; KHAIRY, H. A. Prophylactic postoperative ketorolac improves outcomes in diabetic patients assigned for cataract surgery. **Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)**, v.7, p.1245, 2013.

ESTEROIDEOS, R. Corneal melting and topical nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v. 84, p. 311-314, 2009.

ESSEPIAN, John P.; RAJPAL, Rajesh; O'BRIEN, Terrence P. Tandem scanning confocal microscopic analysis of ciprofloxacin corneal deposits in vivo. **Cornea**, v. 14, n. 4, p. 402-407, 1995.

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

FELDMAN, H.; KINMAN, J.L.; BERLIN, J.A.; HENNESSY, S.; KIMMEL, S.E.; FARRAR, J.; CARSON, J.L.; STROM, B.L. Parenteral ketorolac: the risk for acute renal failure. **Annals of internal medicine**, v. 126, n. 3, p. 193-199, 1997.

FERRAZ, L. C.B.; SCHELLINI, S. A.; GREGRIO, E. A. Efeito do colírio de 5-fluorouracil sobre o epitélio corneano íntegro de coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 493-7, 2003.

FOETS, B.; MISSOTTEN, L.; VANDERVEEREN, P.; GOOSSENS, W. Prolonged survival of allogeneic corneal grafts in rabbits treated with topically applied cyclosporin A: systemic absorption and local immunosuppressive effect. **British Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 8, p. 600-603, 1985.

FLÓRIO, J.C.; SOUSA, A.B. Farmacocinética. In: SPINOSA, H.S. et al. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 5 ed, cap. 4, p. 33-35.

FLÓRIO J.C. Mecanismo de ação e relação dose/resposta. In: SPINOSA, H.S. et al. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 5 ed., cap.3, p. 23.

FRAUNFELDER, F. W. Corneal toxicity from topical ocular and systemic medications. **Cornea**, v. 25, n. 10, p. 1133-1138, 2006.

GINSKI, J. M.; POLLI, J. E. Prediction of dissolution/absorption relationships from a dissolution/ Caco-2 system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 177, n. 1, p. 117-125, 1999.

GAYNES, B. I.; FISCELLA, R. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for ophthalmic use. **Drug Safety**, v. 25, n. 4, p. 233-250, 2002.

GILLIS, J. C.; BROGDEN, R. N. Ketorolac: A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in pain management. **Drugs**, v. 53, n. 1, p. 139-188, 1997.

GELATT, K.N.(a) Doenças e cirurgia da conjuntiva do cão. In:_____ **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2000, cap. 5, p. 95-96.

GELATT, K.N.(b) Oftalmologia felina. In:_____ **Manual de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2000, cap. 12, p. 313-329.

GOA, Karen L.; CHRISP, Paul. Ocular diclofenac. **Drugs & Aging**, v. 2, n. 6, p. 473-486, 1992.

GONZALES-PENAS. Absorption of Sodium Diclofenac in Rabbits. **Arzneimittel Forschung - Drug Research**. v.48, p.931-934, 1998.

GILLS, J. P. Voltaren associated with medication keratitis. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 20, n. 1, p. 110, 1994.

GIULIANO, E. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 707-723, 2004.

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

GUO, Y.; SATPATHY, M., WILSON, G.; SRINIVAS, S.P. Benzalkonium chloride induces dephosphorylation of Myosin light chain in cultured corneal epithelial cells. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 48, n. 5, p. 2001-2008, 2007

HARCOURT-BROWN, F. Ophthalmic diseases. In:_____ **Textbook of Rabbit Medicine**. London, 2002, cap 11, p.292-4.

HERNANDEZ, E.E. Mantenimiento de la midriasis perioperatoria en cirugía de cataratas con diclofenac sódico. **Revista Oftalmológica Venezolana**. 1999. <
<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=259456&indexSearch>> Acesso em: 12 ago. 2013.

HOFFMANN, F. The surface of epithelial cells of the cornea under the scanning electron microscope. **Ophthalmic Research**, v. 3, n. 4, p. 207-214, 1972.

HSU, K. The Ocular and Systemic Adverse Effects of Topical 0.1% Diclofenac in Healthy Cats. 2013. **Dissertação de Mestrado**.
<https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/7439/Hsu_Kimberly_201308_MSc.pdf?sequence>. Acesso em: 10 out. 2013.

IRIT, B. The Effect of Topical Steroids on Blood Glucose Profile in Diabetic Patients. **Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology**, v.2, n.2, p.1-3, 2011.

ISENBERG, S.; EVERETT, S. Cardiovascular effects of mydriatics in low-birth-weight infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 105, n. 1, p. 111, 1984.

JERICÓ, M.M.; ANDRADE, S.F. Antiinflamatórios. In: ANDRADE, S.F. Manual de Terapêutica Veterinária. São Paulo: Roca, 2008. 3 ed. cap. 7. p. 121-132.

KIM, S. J.; FLACH, A. J.; JAMPOL, L. M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 55, n. 2, p. 108-33, 2010.

KUMPULAINEN, E.; KOKKI, H.; LAISALMI, M.; HEIKKINEN, M.; SAVOLAINEN, J.; RAUTIO, J.; LEHTONEN, M. How readily does ketorolac penetrate cerebrospinal fluid in children? **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 495-501, 2008.

LEVY, Y.; ZADOK, D. Systemic side effects of ophthalmic drops. **Clinical Pediatrics**, v. 43, n. 1, p. 99, 2004.

LI, J.; ZHAO, H.; OKEKE, C.I.; LI, L.; LIU, Z.; YIN, Z.; FAN, L. Comparison of systemic absorption between ofloxacin ophthalmic in situ gels and ofloxacin conventional ophthalmic solutions administration to rabbit eyes by HPLC-MS/MS. **International Journal of pharmaceuticals**, v. 450, n. 1, p. 104-113, 2013.

LIMA FILHO, A.A.S.; BATISTUZZO, J.A.O. **Formulações magistrais em oftalmologia**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2011, p.15.

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

- MA, Y.; NIU, R.; SUN, Z.; WANG, J.; LUO, G.; ZHANG, J. Inflammatory responses induced by fluoride and arsenic at toxic concentration in rabbit aorta. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 6, p. 849-856, 2012.
- MACY, D. W. Pharmacologic considerations in the cat. **Feline Practice**, v. 22, n. 2, p. 14-18, 1994.
- MANCA, M. L.; ZARU, M.; ENNAS, G.; VALENTI, D.; SINICO, C.; LOY, G.; FADDA, A. M. Diclofenac- β -cyclodextrin binary systems: physicochemical characterization and in vitro dissolution and diffusion studies. **Aaps Pharmscitech**, v.6, n.3, p.464-472, 2005.
- MARAN, N. B.; CALDAS, S. A.; PRADO, J. S.; GOMES, A. D.; TOKARNIA, C.H.; FARIAS BRITO, M. *Intoxicação experimental por Metternichia princeps (Solanaceae) em coelhos*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 872-880, 2012.
- MARTINS, B.C.; RIBEIRO, A.P.; LAUS, J.L.; ORTIZ, J.P.D. Glaucoma. In: LAUS, J.L. **Oftalmologia Clínica e Cirúrgica em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2009, cap. 7, p.160.
- MARINO, C., PALADINO, G. M., SCUDERI, A. C., TROMBETTA, F., MUGRIDGE, K., ENEA, V. In vivo toxicity of netilmicin and ofloxacin on intact and mechanically damaged eyes of rabbit. **Cornea**, v. 24, n. 6, p. 710-716, 2005.
- MARKMAN, H. D.; ROSENBERG, P.; DETTBARN, W. Eye drops and diarrhea. Diarrhea as the first symptom of echothiophate iodide toxicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 271, p. 197, 1964.
- MICHAEL, S.; CID, M.D.; LUTH, J.; PORBANDARWALLA, S.S.; HERRO, A. Incidence of Corneal Melt in Clinical Practice: Our Experience vs. A Meta-Analysis of the Literature. **Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology**, 2012.
- MIYAZAKI, Yoshinori; MATSUO, Toshihiko; KURABAYASHI, Yuzuru. Immobilization stress induces elevation of intraocular pressure in rabbits. **Ophthalmic Research**, v. 32, n. 6, p. 270-277, 2000.
- MORÁN, G. J. **Estudio de los cambios morfológicos del epitelio corneal en un modelo animal de ojo seco**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina) - Universitat de Barcelona, Barcelona. 2006. < <http://hdl.handle.net/2445/35179>>. Acesso em: 23 mar. 2010.

MORGAN, R. V.; ABRAMS, K. L.; KERN, T. J. Feline eosinophilic keratitis: A retrospective study of 54 cases:(1989-1994). **Veterinary and Comparative Ophthalmology (USA)**,v.6, p.131-34, 1996.

NOMOTO, H.; SHIRAGA, F.; KUNO, N.; KIMURA, E.; FUJII, S.; SHINOMIYA, K.; BABA, T. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 10, p. 4807-4813, 2009.

ORIÁ, A. P. Glaucoma secundário em cães e gatos. **Medicina Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 13-22, 2013.

PAWLEY, J. B. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. **Scanning-New York** , v. 19, p. 324-336, 1997.

PLEYER, U.; LUTZ, S.; JUSKO, W.J.; NGUYEN, K.D. Ocular absorption of topically applied FK506 from liposomal and oil formulations in the rabbit eye. **Investigative Ophthalmology & Visual science**, v. 34, n. 9, p. 2737-2742, 1993.

PFISTER, R. R. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 12, n. 9, p. 654-668, 1973.

PROBST, V, E.; MACHAT, Jeffery J. Corneal subepithelial infiltrates following photorefractive keratectomy. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 22, n. 3, p. 281, 1996.

PROKSCH, J. W.; GRANVIL, C.P.; SIOU-MERMET, R.; COMSTOCK, T.L., PATERNO, M.R.; WARD, K.W. Ocular pharmacokinetics of besifloxacin following topical administration to rabbits, monkeys, and humans. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 335-344, 2009.

PRINCE, J.H. **The Rabbit in Eye Research**. Springfield: Charles C. Thomas; 1964. p 87-88.

POWELL, C.C.; LAPPIN, M.R. Diagnosis and treatment of feline uveitis. **Compendium**, v.23, N.3, P.258-66, 2001.

POLANSKY, J. R. Side effects of topical ophthalmic therapy with anti-inflammatory steroids and [beta]-blockers. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 3, n. 2, p. 259-272, 1992.

RUIZ, V.; URRUTIA, I. Estudio comparativo entre el diclofenaco sódico al 0,1 % y la dexametasona como tratamiento postquirúrgico de la cirugía de cataratas. **Microcirugía Ocular**. 2004. Disponível em: < <http://www.oftalmo.com/secoir/secoir2004/rev04-4/04d-05.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

SIGURDSSON, H. H.; KONRAETHSDOTTIR, F.; LOFTSSON, T.; STEFANSSON, E. Topical and systemic absorption in delivery of dexamethasone to the anterior and posterior segments of the eye. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 85, n. 6, p. 598-602, 2007.

SINGH, G. B.; ATAL, C. K. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-Boswellia serrata, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. **Agents and Actions**, v. 18, n. 3-4, p. 407-412, 1986.

SUBRAMANIAM, S.; SUBRAMANIAM, R., RAJAPANDIAN, S.; UTHRAPATHI, S.; GNANAMANICKAM, V.R.; DUBEY, G.P. Anti-atherogenic activity of ethanolic fraction of terminalia arjuna bark on hypercholesterolemic rabbits. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/487916/abs>> Acesso em: 18 mar. 2014.

SUN, R.; GIMBEL, H.V. Effects of topical ketorolac and diclofenac on normal corneal sensation. **Journal of Refractive Surgery**, v. 13, n. 2, p. 158-161, 1996.

SCHALNUS, R. Topical nonsteroidal anti-inflammatory therapy in ophthalmology. **Ophthalmologica**, v. 217, n. 2, p. 89-98, 2003.

STROOBANTS, A.; FABRE, K.; MAUDGAL, P. C. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on the rabbit corneal epithelium studied by scanning electron microscopy. **Bulletin de la Société Belge d'Ophthalmologie**, v. 276, p. 73-82, 2000.

SITENGA, G. L.; EDSEL, B.; VAN DELLER, R.G.; YOUNGE, B.R.; LEAVITT, J.A. Asthma caused by topical application of ketorolac. **Ophthalmology**, v. 103, n. 6, p. 890-892, 1996.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 377 – 381, 2007.

SHARIR, M. Exacerbation of asthma by topical diclofenac. **Archives of Ophthalmology**, v. 115, n. 2, p. 294, 1997.

SOUSA, S.J.F.; ROMANO, A.C.; ESPANA, E.; YOO,S.H.; TSENG,S.C.G.; GOMES,J.A.P. Anatomia Funcional da superfície ocular. In: GOMES, J.A.P. et al. **Superfície Ocular**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006, cap. 1, p.3-10.

SOUZA, N.L.; MERUSSE, L.B. A utilização de animais de Laboratório In: **Manual para Técnicos em Bioterismo** - Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). 2ª ed. São Paulo: Winner Graph; 1996, cap. 1, p.3-10.

SPARKES, A.H. ; HEIENE, R.; LASCELLES, B.D.X.; MALIK,R.; REAL,L.; ROBERTSON,S.; TAYLOR,P. ISFM and AAFP consensus guidelines: long-term use of NSAIDs in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 7, p. 521-538, 2010.

SHER, N.A.; KRUEGER,R.R.; TEAL,P.; JANS, R.G.; EDMISON,D. Role of topical corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory drugs in the etiology of stromal infiltrates after excimer photorefractive keratectomy. **Journal of Refractive and Corneal Surgery**, v. 10, n. 5, p. 587-588, 1993.

SHIMAZAKI, J.; SAITO,H.; YANG,H.Y.; TODA,I.; FUJISHIMA,H.; TSUBOTA,K. Persistent epithelial defect following penetrating keratoplasty: an adverse effect of diclofenac eyedrops. **Cornea**, v. 14, n. 6, p. 623-627, 1995.

SRINIVASAN, R. Topical ketorolac tromethamine 0.5% versus diclofenac sodium 0.1% to inhibit miosis during cataract surgery. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 28, n. 3, p. 517-520, 2002.

STILL: solução oftálmica de diclofenaco sódico 0,1%. Responsável técnico Flávia Regina Pegore. Guarulhos: Allergan, [2013] **Bula de remédio**. Disponível em <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25524-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25524-1-0].PDF)>. Acesso em: 21 out. 2013.

SAMUELSON, D.A. Ophthalmic anatomy. In: GELATT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott William & Wikins, 1999, p.31-42.

SITENGA G.L., ING E.B., VAN DELLEN R.G. YOUNGE B.R., LEAVITT J.A.: Asthma caused by topical application of ketorolac. **Ophthalmology**, v.103, p. 890-892, 1996.

SHIMAZAKI, J.; SAITO, H.; YANG, H.Y. Persistent epithelial defect following penetrating keratoplasty: an adverse effect of diclofenac eyedrops. **Cornea**, v. 14, n. 6, p. 623-627, 1995.

SHARIR, M. Exacerbation of asthma by topical diclofenac. **Archives of Ophthalmology**, v. 115, n. 2, p. 294, 1997.

TASAKA A. C. Antiinflamatórios não esteroidais. In SPINOSA H.S. et al **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 5 ed. cap. 21. p. 245-260.

TANG-LIU, DD-S.; LIU, S. S.; WEINKAM, R. J. Ocular and systemic bioavailability of ophthalmic flurbiprofen. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 12, n. 6, p. 611-626, 1984.

TOUTAIN, P., FERRAN, A.; BOUSQUET-MÉLOU, A. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Handbook of Experimental Pharmacology**, New York, v. 199, n. 1, p. 19-48, 2010.

TRIPATHI, R.C.; TRIPATHI, B. J.; HAGGERTY, C. Drug-induced glaucomas. **Drug Safety**, v. 26, n. 11, p. 749-767, 2003.

THERMES, Florence; MOLON-NOBLOT, S.; GROVE, Jeffrey. Effects of acetylcysteine on rabbit conjunctival and corneal surfaces. A scanning electron microscopy study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 11, p. 2958-2963, 1991.

TOWNSEND, Wendy M. Canine and feline uveitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 2, p. 323-346, 2008.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. F.; COLLINS, C. H.. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova [online]**, v. 25, n.4, p. 616-623, 2002.

URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. **Survey of Ophthalmology**, v. 37, n. 6, p. 435, 1993.

VILARDO, F.E.S. Lagomorpha (coelho, lebre, lebre-assobiadora) in Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., & Catão-Dias, J. L. (2007). *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. Roca, cap. 27, p. 415-419

VITA SOBRINHO, J.B.; BATISTUZZO, J.A.O. Iatrogenia ocular. In: NAKANAMI, C.R. et al. **Oftalmopediatria**. São Paulo: Roca, 2010, cap. 48, P. 587-8.

WALDE, I.; SCHAFFER, E.H.; KOSTIN, R.G. **Atlas de Clínica Oftalmológica do Cão e do Gato**. São Paulo: Manole, 1998, cap.1, p. 12.

WOODWARD, K.N. Adverse effects of veterinary pharmaceutical products in animals. In _____ **Veterinary Pharmacovigilance**. Wiley-Blackwel, 2009, cap. 17, p.393-4.

ZANETTI, F.R. FULCO, E.A.M., CHAVES, F.R.P.; da COSTA PINTO, A.P.; ARIETA, C.E.L.; LIRA,R.P.C. Effect of preoperative use of topical prednisolone acetate, ketorolac tromethamine, nepafenac and placebo, on the maintenance of intraoperative mydriasis during cataract surgery: A randomized trial. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 60, n. 4, p. 277, 2012.

ZHAN, G. Steroid glaucoma: Corticosteroid- induced ocular hypertension in cats. **Experimental Eye Research**, v.54, n.2, p.211- 218, 1992.

ZUPPA, A.F.; MONDICK,J.T.; DAVIS,L.; COHEN,D. Population pharmacokinetics of ketorolac in neonates and young infants. **American Journal of Therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 143-146, 2009.

ANEXO



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UFCSPA

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 14-147

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

FERNANDA BASTOS DE MELLO
JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO
JOÃO ANTONIO PIGATTO
FABIANA QUARTIERO PEREIRA
ANA CRISTINA DA CUNHA

Título: REPERCUSSÕES LOCAIS E SISTEMICAS DO USO TÓPICO EM MÉDIO PRAZO DE
CETOROLACO DE TROMETAMINA E DICLOFENACO SÓDICO EM COLEHOS DA
RAÇA
NOVA ZELÂNDIA.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 05 de setembro de 2014.


Katya V. Rigatto
Coordenadora do CEUA
UFCSPA

