Heloisa Helena Abil Russ Giacometti

**Alterações conjuntivais induzidas por
análogos das prostaglandinas e
maleato de timolol: estudo
histomorfométrico**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.**

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Vital Paulino Costa

São Paulo

2007

Heloisa Helena Abil Russ Giacometti

**Alterações conjuntivais induzidas por
análogos das prostaglandinas e
maleato de timolol: estudo
histomorfométrico**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.**

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Vital Paulino Costa

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Giacometti, Heloisa Helena Abil Russ

Alterações conjuntivais induzidas por análogos das prostaglandinas e maleato de timolol : estudo histomorfométrico / Heloisa Helena Abil Russ Giacometti. -- São Paulo, 2007.

**Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Oftalmologia.

Orientador: Vital Paulino Costa.

Descritores: 1.Prostaglandinas sintéticas 2.Timolol

3.Conjuntiva 4.Glaucoma/terapia 5.Coelhos

USP/FM/SBD-173/07

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Regina e Amin pelo incentivo

Ao Hércio pelo apoio incondicional

Ao Guilherme, minha maior criação

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Vital Paulino Costa, orientador, mentor e amigo, pela dedicação e paciência. Seu brilhantismo acadêmico estimula a formação de seguidores e seu profissionalismo marcante imprimiram uma orientação segura ao longo do doutoramento, minha profunda gratidão.
- Ao Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira, da Universidade Federal do Paraná, com sua dedicação extrema à pesquisa, por proporcionar a viabilização da parte experimental e histológica.
- Ao Prof. Dr. Newton Kara-José, pelo carinho e confiança em mim depositados, além do estímulo científico constante.
- À Dra. Lismary Mesquita, do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, pelo auxílio na histologia e cessão de fotos.
- À Dra. Ruth Santo, da Clínica Oftalmológica da Universidade de São Paulo, pela cessão de fotos.
- Aos residentes Mario Adolfo Correa Neto e Eduardo Strobel Von Linsingen, e à Dra. Sílvia Regina Valgas, do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, pelo auxílio bibliográfico e na execução da parte experimental.
- Ao Sr. João Brito de Freitas, do Centro de Cirurgia Experimental do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, pelo grande auxílio na parte experimental.
- À Sra. Regina Ferreira de Almeida, secretária da pós-graduação da Universidade de São Paulo, pelo apoio logístico que minimizou a distância em todas as horas, um elo que pretendo manter.

Meus sinceros agradecimentos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptadas de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª. Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos foram feitas de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO

SUMMARY

1.INTRODUÇÃO	1
1.1.Tratamento medicamentoso do glaucoma	5
1.1.1. Agentes autonômicos colinérgicos	5
1.1.1.1. Pilocarpina	5
1.1.1.2. Carbacol	7
1.1.1.3. Iodeto de Ecotiofato	7
1.1.2. Agentes autonômicos adrenérgicos	8
1.1.2.1. Epinefrina	8
1.1.2.2. Dipivefrina	9
1.1.2.3. Alfa-Agonistas	10
1.1.2.4. Clonidina	10
1.1.2.5. Apraclonidina	10
1.1.2.6. Brimonidina	11
1.1.2.7. Beta-bloqueadores	12

1.1.3. Inibidores da anidrase carbônica	13
1.1.3.1. Sistêmicos	13
1.1.3.2. Tópicos	14
1.1.4. Prostaglandinas	15
1.1.4.1. Definição e histórico	15
1.1.4.2. Bioquímica	17
1.1.4.3. Mecanismo de ação	18
1.1.4.4. Análogos de prostaglandinas para o tratamento do glaucoma	20
1.1.4.4. Latanoprost	21
1.1.4.4.2. Travoprost	24
1.1.4.4.3. Bimatoprost	26
1.1.4.5. Efeitos colaterais dos análogos da prostaglandina	27
2. EFEITOS DAS MEDICAÇÕES ANTI-GLAUCOMATOSAS SOBRE A	
SUPERFÍCIE OCULAR	29
2.1. Anatomia conjuntival	29
2.2. Técnicas para avaliação da conjuntiva	33
2.2.1. Biópsia conjuntival	33
2.2.2. Citologia conjuntival ou esfregaço conjuntival	34
2.2.3. Citologia de impressão	35

2.3. Efeitos induzidos pelas drogas utilizadas no tratamento do	
glaucoma sobre a superfície ocular.....	36
2.3.1. Agentes autonômicos colinérgicos.....	37
2.3.1.1. Pilocarpina	37
2.3.1.2. Carbacol	37
2.3.1.3. Iodeto de ecotiofato	37
2.3.2. Agentes autonômicos adrenérgicos	38
2.3.2.1. Epinefrina	38
2.3.2.2. Dipivefrina	38
2.3.2.3. Alfa-agonistas	38
2.3.2.3.1. Apraclonidina	38
2.3.2.3.2. Clonidina	39
2.3.2.3.3. Brimonidina	39
2.3.2.4. Beta-bloqueadores	39
2.3.3. Inibidores tópicos da anidrase carbônica	40
2.3.4. Análogos de prostaglandinas	40
2.3.5. O papel dos conservantes	42
2.4. Conseqüências das alterações conjuntivais sobre o sucesso da cirurgia	
filtrante	43
2.5. Justificativa	44

2.6. Objetivos	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Critérios de inclusão.....	48
3.2. Critérios de exclusão.....	49
3.3. Constituição dos grupos.....	49
3.4. Métodos.....	50
3.4.1. Biópsia conjuntival.....	50
3.4.1.1. Técnica cirúrgica.....	50
3.4.2. Pós-operatório.....	52
3.4.3. Preparação do material para histologia e coloração.....	52
3.4.4. Análise qualitativa do infiltrado inflamatório.....	53
3.4.5. Avaliação histomorfométrica.....	56
3.5. Aspectos éticos.....	59
3.6. Análise estatística.....	60
4. RESULTADOS	61
4.1. Peso dos coelhos	62
4.2. Comparação com olhos contra-laterais.....	62
4.2.1 Células caliciformes.....	62
4.2.2. Espessura epitelial.....	67
4.2.3. Número de Vasos.....	70

4.2.4. Diâmetro vascular	73
4.2.5. Reação inflamatória.....	74
4.3. Comparação entre as medicações	79
5. DISCUSSÃO	80
5.1. Os análogos de prostaglandinas e reação inflamatória.....	84
5.2. Alterações vasculares.....	91
5.3. Alterações de células caliciformes	92
5.4. Alterações epiteliais e subepiteliais.....	96
5.5. O papel dos conservantes.....	99
5.6. Possível efeito protetor das prostaglandinas.....	106
5.7. Considerações finais.....	109
6. CONCLUSÕES	111
7. ANEXOS	113
7.1. Anexo A: Aprovação da Comissão de Ética	114
8. REFERÊNCIAS	127

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Número médio de células calciformes no epitélio conjuntival de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	62
Tabela II: Número médio de células calciformes no epitélio conjuntival de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio.....	64
Tabela III: Espessura epitelial média da conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e cloreto de benzalcônio.....	67
Tabela IV: Espessura epitelial média da conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e cloreto de benzalcônio.....	68
Tabela V: Número médio de vasos na conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	70
Tabela VI: Número médio de vasos na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio.....	71
Tabela VII: Diâmetro vascular médio na conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	73

Tabela VIII: Variação do diâmetro vascular na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio.....	74
---	----

Tabela IX: Intensidade do infiltrado inflamatório focal conjuntival nos grupos tratados (OE) com bimatoprost, travoprost, latanoprost, maleato de timolol e cloreto de benzalcônio e seus controles (OD) aos oito e trinta dias.....	75
---	----

Tabela X: Intensidade do infiltrado inflamatório difuso conjuntival nos grupos tratados (OE) com bimatoprost, travoprost, latanoprost, maleato de timolol e cloreto de benzalcônio e seus controles (OD) aos oito e trinta dias.....	76
---	----

Tabela XI: Comparação entre as médias dos olhos tratados com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e lubrificante com conservante.....	79
---	----

Tabela XII: Peso dos coelhos.....	115
--	-----

Tabela XIII: Células caliciformes no epitélio conjuntival de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	116
---	-----

Tabela XIV: Células caliciformes no epitélio conjuntival de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	117
---	-----

Tabela XV: Espessura epitelial da conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	118
Tabela XVI: Espessura epitelial da conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	118
Tabela XVII: Número de vasos na conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	119
Tabela XVIII: Número de vasos na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	120
Tabela XIX: Diâmetro vascular na conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	121
Tabela XX: Diâmetro vascular na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.....	122
Tabela XXI: Células caliciformes na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.....	123
Tabela XXII: Espessura epitelial da conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.....	124

Tabela XXIII: Número de vasos na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.....	125
---	-----

Tabela XXIV: Diâmetro vascular na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.....	126
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organograma demonstrando o ciclo do ácido araquidônico com a formação das prostaglandinas.....	16
Figura 2. Estrutura química da PGF 2α.....	22
Figura 3: Estrutura química de latanoprost, cuja fórmula molecular é C ₂₆ H ₄₀ O ₅	22
Figura 4: Estrutura química de travoprost, cuja fórmula molecular é C ₂₆ H ₃₅ F ₃ O ₆	24
Figura 5: Estrutura química de bimatoprost, cuja fórmula molecular é C ₂₅ H ₃₇ NO ₄	26
Figura 6: Fotomicrografia com aumento de 400 x demonstrando conjuntiva bulbar e palpebral. Coloração HE. Fonte: Krashmer e Spalton, 1996.....	30
Figura 7: Células conjuntivais da camada basal epitelial coradas por Leischman em lâmina proveniente de raspado conjuntival. As setas apontam o núcleo ovalado característico desta camada. Fonte: Dra. Lismary Mesquita.	31
Figura 8: Células caliciformes provenientes de biópsia conjuntival coradas por PAS. Aumento de 200x. Fonte: Dra. Ruth Santo.	32
Figura 9: Células conjuntivais com aumento do núcleo provenientes de raspado conjuntival coradas por GIEMSA. As setas representam os núcleos. Aumento 400x.Fonte: Dra. Lismary Mesquita.....	35

Figura 10: Método de coleta de citologia de impressão, utilizando papel filtro. Fonte: Krashmer, 1997.	35
Figura 11: Lâmina proveniente de citologia de impressão da superfície epitelial conjuntival, demonstrando células com núcleo picnótico e arquitetura poligonal. Fonte Krashmer, 1997.	36
Figura 12: Imagem do centro cirúrgico do Centro de Estudos Experimentais do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba durante procedimento de biópsia dos coelhos.	51
Figura 13: Foto do procedimento cirúrgico (biópsia conjuntival), conforme descrito na técnica cirúrgica.	52
Figura 14: Fotomicrografia com aumento de 400x demonstrando infiltrado inflamatório leve na conjuntiva de coelho, coloração HE.	54
Figura 15: Fotomicrografia com aumento de 400x mostrando infiltrado inflamatório moderado da conjuntiva de coelho, coloração HE.	55
Figura 16: Fotomicrografia com aumento de 400x mostrando infiltrado inflamatório intenso e difuso da conjuntiva, coloração HE.	56
Figura 17: Fotografia demonstrando o funcionamento do programa de computador Image Pro-Plus. Na foto, observa-se a régua virtual de 200 micra e contagem de células caliciformes. Imagem referente ao grupo tratado com bimatoprost a 30 dias.	57
Figura 18: Fotografia demonstrando o funcionamento do programa de computador Image Pro-Plus. Na foto, observa-se a régua virtual	

de 200 micra, mensuração da espessura epitelial e medida do diâmetro vascular. Imagem referente ao grupo tratado com maleato de timolol aos 8 dias.....58

Figura 19: Fotografia demonstrando funcionamento do programa de computador Image Pro-Plus. Na foto, observa-se a mensuração da espessura epitelial e medida do diâmetro vascular em aumento de 400x. Imagem referente ao grupo tratado com travoprostá aos 8 dias.....59

Figura 20: Fotomicrografia (400x) de amostra conjuntival do olho controle (A) e olho tratado (B) do grupo travoprostá após 8 dias de tratamento. Coloração PAS. Observa-se aumento do número de células caliciformes em B.....63

Figura 21: Fotomicrografia (400x) de amostra conjuntival do olho controle (A) e olho tratado (B) do grupo bimatoprostá após 30 dias de tratamento. Coloração PAS. Observa-se aumento do número de células caliciformes em B.....65

Figura 22: Fotomicrografia (400x) de amostra conjuntival do olho controle (A) e do olho tratado (B) do grupo latanoprostá após 30 dias de tratamento. Coloração PAS. Observa-se aumento do número de células caliciformes em B.....66

Figura 23: Fotomicrografia (400x) de amostra conjuntival do olho controle (A) e do olho tratado (B) do grupo timolol após 30 dias de

tratamento. Coloração HE. Observa-se aumento da espessura epitelial em (B).69

Figura 24: Fotomicrografia (400x) de amostra conjuntival do olho controle (A) e do olho tratado do grupo timolol (B) após 30 dias de tratamento. Coloração HE. Nota-se o aumento do número de vasos em (B).72

Figura 25: Fotomicrografia (400x) de amostra conjuntival de olho controle (A) e olho tratado (B) após 30 dias de tratamento com CBA. Coloração HE. Nota-se infiltrado inflamatório focal leve em (B).77

Figura 26: Fotomicrografia (400x) de amostra conjuntival de olho controle (A) e olho tratado (B) após 30 dias de tratamento com maleato de timolol. Coloração HE. Nota-se infiltrado inflamatório intenso, congestão vascular e fibrose subepitelial em (B).78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGIS	Advanced Glaucoma Intervention Study
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância em Saúde
ARVO	The Association for Research in Vision and Ophthalmology
BAC	Benzalkonium Chloride
BSS	Solução salina balanceada
CBA	Cloreto de Benzalcônio
CDT50	Tempo de exposição necessário para promover 50% de dano celular
DP	Desvio Padrão
EMC	Edema macular cistóide
EMGT	Early Manifest Glaucoma Trial
<i>Et al</i>	E colaboradores
FDA	Food and drug administration
FNT	Fator de necrose tumoral
GPPA	Glaucoma primário de ângulo aberto
HE	Hematoxilina-Eosina
HLA	Antígeno de histocompatibilidade
HO	Hipertensão ocular
IL	Interleucina
Kg	Quilograma
mmHg	Milímetro de mercúrio
MMP	Metaloproteinase

μm	Micrômetro
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
OHTS	Ocular Hypertension Treatment Study
PAS	Periodic Acid Schiff
PCNA	Antígeno antiproliferativo nuclear celular
PG	Prostaglandina
PGE_1	Prostaglandina E_1
PGE_2	Prostaglandina E_2
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$
PIO	Pressão Intra-ocular
TIMP	Inibidor tecidual

Giacometti HHAR. Alterações conjuntivais induzidas por análogos das prostaglandinas e maleato de timolol: estudo histo-morfométrico (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007. p 155.

O objetivo deste estudo foi comparar alterações histológicas induzidas por análogos de prostaglandinas e maleato de timolol na conjuntiva de coelhos. Cinquenta coelhas da raça Nova Zelândia com idade e peso semelhantes foram divididos em cinco grupos de dez animais. Os olhos esquerdos foram tratados com uma gota diária de bimatoprost 0,03%, travoprost 0,004%, latanoprost 0,005%, maleato de timolol 0,5% ou lágrimas artificiais contendo cloreto de benzalcônio (CBA) durante 30 dias. Os olhos contra-laterais serviram como controles. Realizaram-se biópsias na conjuntiva limbar superior com dimensões de 5 mm x 5 mm no oitavo e trigésimo dias em cinco coelhos de cada grupo. A conjuntiva foi imediatamente fixada com formaldeído a 10% por 24 horas, seguido de coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) e avaliação qualitativa por microscopia óptica. A avaliação histo-morfométrica quantitativa foi realizada usando o programa Image Pro-Plus 4.5. Os parâmetros avaliados foram: infiltrado inflamatório, espessura epitelial, número de células calciformes, diâmetro e número de vasos sanguíneos. Observou-se leve infiltrado inflamatório focal no tecido conectivo subepitelial nos olhos controle e do grupo CBA, que consistia de aglomerados de linfócitos e raros neutrófilos. Todos os demais grupos exibiram no oitavo e trigésimo dias de tratamento infiltrado inflamatório moderado, composto por

linfócitos e neutrófilos, que foi mais denso no grupo tratado com maleato de timolol do que nos grupos dos análogos de prostaglandinas. No trigésimo dia, o grupo que recebeu timolol mostrou aumento da densidade subepitelial de colágeno e aumento estatisticamente significativo da espessura epitelial ($P=0,004$), que não foram observados nos demais grupos. Observou-se um aumento estatisticamente significativo do número de vasos no grupo tratado com timolol ($P=0,001$). O diâmetro vascular no grupo que recebeu travoprostá apresentou aumento estatisticamente significativo no oitavo dia de tratamento ($P=0,008$) e redução no 30º dia ($P=0,035$). A densidade de células caliciformes aumentou significativamente no grupo que recebeu travoprostá no oitavo dia ($P=0,001$) e no 30º dia nos grupos tratados com bimatoprostá ($P=0,002$) e latanoprostá ($P=0,009$). Conclui-se que, na conjuntiva de coelhos, o número de células caliciformes aumenta com o uso de análogos das prostaglandinas. O estudo sugere que essas drogas, entretanto, induzem menos alterações que o maleato de timolol na conjuntiva de coelhos.

Descritores: 1. Prostaglandinas sintéticas 2. Timolol 3. Conjuntiva
4. Glaucoma/terapia 5. Coelhos

.

Giacometti HHAR. Conjunctival changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate: a histomorphometric study (thesis). São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007. p 155.

The purpose of this study was to compare histological changes induced by prostaglandin analogues and timolol maleate in the rabbit conjunctiva. Fifty New Zealand female rabbits with similar age and weight were divided in five groups of 10 animals. The left eyes were treated with one daily drop of bimatoprost 0,03%, travoprost 0,004%, latanoprost 0,005%, timolol maleate 0,5% or artificial tears containing benzalkonium chloride (BAC) for 30 days. The fellow eyes served as controls. Limbal superior conjunctival biopsies of 5 mm x 5 mm were performed at the 8th and 30th day in five rabbits of each group each time. The conjunctiva was immediately fixed with 10% formaldehyde for 24 hours, followed by Hematoxiline-Eosine (HE) and Periodic Acid Schiff (PAS) staining and optical qualitative microscopic evaluation. Morphohistometric quantitative analyses were conducted using the Image Pro-Plus 4.5 software. The evaluated parameters were: inflammatory infiltrate, epithelial thickness, number of goblet cells, diameter and number of blood vessels. A low level infiltration, consisting of localized clusters of lymphocytes and rare neutrophils, was observed in the subepithelial connective tissue of the control eyes and in the BAC group. At the 8th and 30th day post treatment, all other groups exhibited a diffuse inflammatory infiltrate, composed by lymphocytes and neutrophils, which was denser in the timolol group than in the prostaglandin analogue groups. At the

30th day, the timolol group also showed an increased subepithelial collagen density and a significant increase in epithelial thickness ($P=0.004$), which was not present in the other groups. A significant increase ($P=0.001$) in the number of blood vessels was observed in the group treated with timolol. An initial increase in the vascular diameter was observed at the 8th day in the travoprost group ($P=0.008$) although a significant reduction was observed at the 30th day ($P=0.035$). The goblet cell density was significantly increased at the 8th day in the group treated with travoprost ($P=0.001$) and at the 30th day in those treated with bimatoprost ($P=0.002$) and latanoprost ($P=0.009$). We conclude that an increase in the number of goblet cell was initially observed with the use of all prostaglandin analogues. This study suggests that these drugs, however, induce fewer changes than timolol maleate in the rabbit conjunctiva.

Descriptors: 1. Synthetic prostaglandins 2. Timolol 3. Conjunctiva
4. Glaucoma/therapy 5. Rabbits

1. INTRODUÇÃO

O glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) é uma neuropatia óptica crônica, progressiva, de etiologia multifatorial, caracterizada por alterações típicas do disco óptico e da camada de fibras nervosas da retina, com repercussões características no campo visual. É acompanhado, na maioria das vezes, por pressões intra-oculares (PIOs) acima de níveis considerados estatisticamente normais. Considera-se o aumento da PIO o principal fator de risco para a instalação e progressão do glaucoma (Gordon et al., 2002; SBG, 2005).

Segundo dados da OMS de 2002, o glaucoma é a segunda maior causa de cegueira no mundo e a principal causa de cegueira irreversível, havendo cerca de cinco milhões e duzentos mil cegos por glaucoma no mundo (Thylefors et al., 1998; Resnikoff et al., 2004). Em 1997, Quigley (1997) estimava que dois milhões e quinhentos mil pacientes fossem portadores de glaucoma nos Estados Unidos na década passada e que mais de 130 mil pessoas estariam legalmente cegas pela doença.

O tratamento do glaucoma de ângulo aberto e da hipertensão ocular é realizado por meio da redução da PIO, e visa evitar o estabelecimento ou progressão do dano ao nervo óptico e do defeito de campo visual. (Musch et al., 1999; Lichter et al., 2001; Tezel et al., 2001). Em geral, a redução da PIO nos pacientes com glaucoma é obtida, inicialmente, com terapia medicamentosa.

O OHTS (Ocular Hypertension Treatment Study), estudo multicêntrico realizado com 1637 pessoas diagnosticadas como hipertensas oculares (PIO entre 24 e 32 mmHg sem dano ao nervo óptico ou defeito de campo visual),

randomizou pacientes para tratamento medicamentoso (cujo objetivo era promover redução de 20% da PIO inicial) ou observação (sem tratamento). Após período de seguimento de cinco anos, 4,4% dos pacientes tratados progrediram, enquanto 9,5% do grupo não-tratado progrediu. Este estudo permitiu concluir que a redução da PIO reduz o risco de progressão para glaucoma em pacientes com hipertensão ocular.

O OHTS também mostrou que um considerável número de pacientes requer múltiplas drogas para redução adequada da PIO. Após cinco anos, 49% dos pacientes necessitaram pelo menos duas medicações para reduzir a PIO, e 9% dos pacientes necessitaram três medicações (Kass et al., 2002). Deve-se enfatizar que a proposta de redução pressórica no OHTS foi modesta (apenas 20%), e que esses índices aumentariam caso fosse estabelecida como meta uma redução pressórica mais significativa.

Outro estudo multicêntrico desenvolvido na década de 90 foi o EMGT (Early Manifest Glaucoma Trial), que incluiu 255 pacientes com glaucoma em fase inicial, seguidos durante quatro anos. Nesse estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos: um deles foi submetido a tratamento (cujo objetivo era reduzir a PIO em 25% do valor inicial), e o segundo grupo não foi submetido a qualquer tratamento. O tratamento inicial foi realizado com beta-bloqueadores (betaxolol), acrescido, se necessário, de latanoprostá ou trabeculoplastia a laser. O EMGT mostrou que 45% dos pacientes tratados progrediram, enquanto 62% dos não tratados apresentaram progressão da doença. (Leske et al, 1999).

O AGIS (Advanced Glaucoma Intervention Study) foi um estudo multicêntrico, com duração de oito anos, que envolveu 586 olhos de pacientes com glaucoma avançado. O AGIS revelou que o grupo de pacientes que mantiveram PIO menor que 18 mmHg em 100% das visitas ao longo dos 8 anos foi o que apresentou menores taxas de progressão (14,4% em 7 anos). Esse grupo, que apresentou PIO média de 12,3 mmHg, necessitou de medicações para manter a PIO abaixo de 18 mmHg mesmo após trabeculectomia ou trabeculoplastia a laser. Assim, 33,6% dos pacientes desse grupo necessitou usar duas ou mais medicações para atingir PIO menor que 18 mmHg. (AGIS, 2000).

Os estudos supracitados revelam que a redução da PIO diminui o risco de progressão de indivíduos com hipertensão ocular, glaucoma inicial e glaucoma avançado. Além disso, sugerem que um grande número de pacientes requer mais de uma medicação para controlar adequadamente a PIO (AGIS, 2000; Lichter et al., 2001; Kass et al., 2002).

Entretanto, nenhum tratamento medicamentoso é isento de efeitos colaterais. Os parágrafos a seguir listarão as drogas disponíveis para o tratamento do glaucoma e seus efeitos colaterais.

1.1. TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DO GLAUCOMA

As drogas tópicas utilizadas no tratamento do glaucoma dividem-se em: agentes autonômicos, inibidores da anidrase carbônica, e os análogos das prostaglandinas. Os agentes autonômicos subdividem-se em drogas atuantes no sistema colinérgico (parassimpático) e drogas que atuam no sistema adrenérgico (simpático) (Shields et al., 1998).

1.1.1 Agentes autonômicos colinérgicos

Os agentes autonômicos que atuam no sistema colinérgico utilizam como mediador fisiológico a acetilcolina, produzem miose e promovem aumento do escoamento de humor aquoso pela via trabecular. São denominados agonistas colinérgicos ou parassimpaticomiméticos. O estímulo sobre os receptores colinérgicos pode ser direto, por mimetizar a ação da acetilcolina (caso da pilocarpina), ou indireto, prolongando a ação do neurotransmissor por impedir sua degradação sináptica pelas colinesterases, como o iodeto de ecotiofato (Shields et al., 1998).

1.1.1.1. Pilocarpina

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico, que provoca miose por estimular o esfíncter da íris, e altera a configuração da malha trabecular, ocasionando aumento do escoamento de humor aquoso pela via convencional. Apresenta pico do efeito hipotensor em até duas horas após a instilação, tendo duração de ação de seis a oito horas. É utilizada na concentração de 2 a 4 % e a posologia recomendada é de quatro vezes ao dia. (Drance e Nash, 1971; Fellman e Starita, 1990; Costa et al., 2002).

Atualmente, a pilocarpina é usada para reverter o bloqueio pupilar em casos de pacientes com glaucoma de ângulo fechado. A pilocarpina reduz o fluxo uveo-escleral, o que antagoniza o efeito dos análogos das prostaglandinas. Durante anos, a pilocarpina foi utilizada no tratamento do glaucoma, perdendo espaço devido à meia-vida curta, à necessidade de grande número de instilações diárias e aos efeitos colaterais freqüentes (Barsam, 1972; Fellman e Starita, 1990; Shields et al., 1998).

Os efeitos colaterais sistêmicos relatados são secundários à ativação de receptores muscarínicos, como perspiração, salivação, lacrimejamento, e aumento da secreção brônquica. Entretanto, felizmente, são efeitos colaterais raros. Os efeitos colaterais oculares da pilocarpina incluem: cefaléia frontal induzida por espasmo do músculo ciliar, miopia, miose e diminuição da visão, descolamento de retina regmatogênico, efeito cataratogênico, toxicidade ao endotélio corneano e quebra da barreira hemato-aquosa. A ação colinérgica sobre os vasos do segmento anterior causa dilatação dos mesmos com conseqüente quebra da barreira hemato-aquosa e congestão do corpo ciliar.

O uso crônico de mióticos pode induzir fechamento angular em olhos predispostos, visto que a contração do músculo ciliar promove aumento do diâmetro axial do cristalino, favorecendo a aproximação da raiz da íris ao ângulo. (Kaufman et al., 1976; Grierson et al., 1978; Shields et al., 1998).

1.1.1.2. Carbacol

O carbacol é agente parassimpaticomimético que apresenta ação indireta e direta, com duração da ação prolongada (de oito a 12 horas) e pico do efeito hipotensor de 30 minutos a duas horas após sua instilação. Apresenta-se na concentração de 0,75%, 1,5% e 3,0%, e recomenda-se instilação do colírio duas a três vezes ao dia (Shields et al,1998).

O carbacol, um estimulante indireto dos receptores muscarínicos, produz mais efeitos colaterais que a pilocarpina, incluindo maior dor ocular e maior espasmo de acomodação. Atualmente não é mais utilizado no tratamento clínico do glaucoma, sendo disponível apenas para aplicação intracameral no final de cirurgia de catarata. (Hung et al., 1982; Reichert et al., 1988; Shields et al., 1998).

1.1.1.3. Iodeto de Ecotiofato

O iodeto de ecotiofato é uma droga de ação indireta, um forte inibidor da colinesterase, que tem efeito hipotensor similar à pilocarpina, porém com efeitos colaterais mais intensos. O ecotiofato tem ação máxima quatro a seis horas após instilação, seu efeito persiste por até 24 horas, podendo estender-se por até duas semanas. Está disponível nas concentrações de 0,06%, 0,125% e 0,25% (Shields et al., 1998).

Como efeito colateral sistêmico, o iodeto de ecotiofato pode causar depleção da enzima colinesterase, o que pode prolongar uma paralisia respiratória durante anestesia geral ou ainda reações tóxicas com anestésicos (locais ou sistêmicos), recomendando-se sua suspensão seis

semanas antes do procedimento cirúrgico. Raramente induz efeitos parassimpáticos sistêmicos como náusea, diarreia e vômitos. Assim como a pilocarpina, o iodeto de ecotiofato pode apresentar efeito cataratogênico, além de causar quebra de barreira hemato-aquosa e descolamento de retina, principalmente em olhos alto míopes, afácicos ou que apresentam degenerações periféricas tipo *lattice*. O iodeto de ecotiofato também induz formação de cistos de íris, estenose de ponto lacrimal e formação de catarata subcapsular anterior. (Becker et al., 1960; Barsam, 1972; Fellman e Starita, 1990; Shields et al., 1998).

1.1.2. Agentes autonômicos adrenérgicos

Há dois tipos de receptores adrenérgicos: α e β , que utilizam como mediadores fisiológicos a epinefrina e a norepinefrina. Os agonistas ou estimulantes adrenérgicos, ou simpaticomiméticos, podem atuar direta ou indiretamente nos receptores α , β ou em ambos (Shields et al., 1998).

1.1.2.1. Epinefrina

A epinefrina é um agonista adrenérgico não seletivo, atuando nos receptores α e β . Seu mecanismo de ação se dá por aumento do fluxo de humor aquoso pela via trabecular, promovendo redução de 10 a 30% da PIO basal, com efeito máximo duas a seis horas após a instilação, persistindo por 12 a 24 horas. As concentrações disponíveis variam de 0,5% a 2% e a posologia recomendada é de uma gota a cada doze horas. (Drance e Ross, 1970; Kass et al., 1979).

A epinefrina pode causar toxicidade ocular intensa, com sensação de ardência e queimação, hiperpigmentação adenocrômica, conjuntivite folicular e hiperemia intensa. A epinefrina pode ainda resultar em midríase, edema macular cistóide (em olhos afácicos ou pseudofácicos), dano endotelial e hipóxia ocular, porém esses efeitos são raros (Kass et al., 1979; Shields et al., 1998).

Os efeitos colaterais sistêmicos acometem o sistema cardiovascular, resultando em elevação da pressão arterial, taquicardia, tremores e ansiedade (Drance e Ross, 1970; Michels e Maumenee, 1975; Shields et al., 1998).

1.1.2.2. Dipivefrina

A dipivefrina tem ação hipotensora semelhante à epinefrina, porém induz menor reação alérgica (2,9%). Disponível na concentração de 0,1%, é uma pró-droga da epinefrina, tendo mecanismo de ação similar à essa, porém apresenta maior lipossolubilidade que a epinefrina, o que aumenta sua penetração corneana e permite seu uso em menores concentrações (Mandell et al., 1978; Shields et al., 1998).

A dipivefrina induz depósitos pigmentares na conjuntiva, córnea e ducto nasolacrimal, oclusão de ponto lacrimal, midríase e edema macular cistóide em afácicos (10 a 20%) (Costa et al., 2002).

Dentre os efeitos sistêmicos induzidos pela epinefrina e dipivefrina podemos citar taquicardia (25%), arritmias, hipertensão arterial sistêmica e cefaléia (10%) (Kaback et al., 1976; Mandell et al., 1978; Kass et al., 1979).

1.1.2.3. Alfa-Agonistas

Os receptores α -adrenérgicos, quando estimulados, produzem midríase e vasoconstrição mediadas pelo receptor α_1 , além de diminuição da produção de humor aquoso pela ativação dos receptores α_2 . (Shields et al., 1998; Costa et al., 2002).

1.1.2.4. Clonidina

A clonidina é um agente α_2 seletivo, apresenta caráter lipofílico, o que facilita sua rápida passagem para a circulação sanguínea, provocando hipotensão ortostática e redução da pressão arterial diastólica por atuar nos centros vasomotores cerebrais. Devido a essa alta lipossolubilidade, sua aplicação clínica como hipotensor ocular foi restrita (Krieglstein et al., 1978; Hodapp et al., 1981).

Disponível nas concentrações de 0,125%, 0,25% e 0,5%, recomenda-se instilação de uma gota a cada oito horas. Seu efeito hipotensor ocular corresponde à 30 a 40% de seu valor inicial. A clonidina começa a apresentar ação hipotensora ocular uma hora após sua instilação, com pico de ação após três a cinco horas, e seu efeito pode permanecer por até uma semana (Shields et al., 1998; Costa et al., 2002).

1.1.2.5. Apraclonidina

A apraclonidina, agonista adrenérgico derivado da clonidina, também é um agente α_2 seletivo, cujo mecanismo de ação consiste na redução da produção de humor aquoso em 35%, ocasionando redução de 30 a 40% da PIO após três a cinco horas. Era usada para inibir pico pressórico pós-laser,

porém já foi utilizada cronicamente, com duas a três instilações ao dia. Encontrava-se disponível em concentrações de 0,25% e 0,50% (Shields et al., 1998).

A apraclonidina tem como efeitos colaterais sistêmicos boca seca e ressecamento nasal, relatados por 30 a 50% dos pacientes (Abrams et al., 1987). Por sua vez, o maior efeito colateral local é conjuntivite folicular com ou sem dermatite de contato (48% dos pacientes) (Butler et al., 1995), além de retração palpebral e midríase. (Costa et al., 2002).

Outros efeitos colaterais incluem alergia intensa (36%), hiperemia, prurido, lacrimejamento, folículos e edema palpebral em 50% dos pacientes, o que limita seu uso a despeito de sua potência (Abrams et al., 1987; Butler et al., 1995).

1.1.2.6. Brimonidina

A brimonidina é também um agonista do receptor α_2 , que reduz a PIO em 20 a 25% da PIO basal, e deve ser instilado duas a três vezes ao dia. As concentrações disponíveis para instilação são de 0,15% e 0,2% e o pico de sua ação hipotensora ocular é observado duas horas após sua administração (Shields et al., 1998).

Apresenta efeitos colaterais menos freqüentes que a apraclonidina, ocasionando alergia (10 a 15%), redução da PA diastólica, boca seca (30%), fadiga, zumbido (16%) e cefaléia (18%), com efeitos cardiovasculares mínimos. (Toris et al., 1995; Shields et al., 1998; Katz et al., 1999).

Há relatos de alteração da pressão arterial sistólica e diastólica e, em menor extensão, alteração do ritmo cardíaco reportado em usuários da medicação por período superior a um ano, porém essas alterações não são clinicamente significativas (Adkins e Balfour, 1998).

A brimonidina é contra-indicada para uso pediátrico por induzir depressão do sistema nervoso central (Carlsen et al., 1999; Bowman et al., 2004). Al-Shahwan e colaboradores (2005) investigaram população de 83 crianças usuárias de brimonidina e 76% dos envolvidos no estudo apresentaram sonolência e letargia, tendo correlação direta com peso abaixo de 20 kg e idade menor que seis anos, demonstrada através de análise de regressão logística.

1.1.2.7. Beta-bloqueadores

São dois os tipos de receptores β adrenérgicos: β_1 e β_2 . Os receptores β_1 -adrenérgicos, quando estimulados, aumentam a contratilidade cardíaca e lipólise, enquanto os receptores β_2 promovem broncodilatação e vasodilatação. A inibição dos receptores β reduz a PIO por diminuir a produção de humor aquoso em 30 a 50%, ocasionando redução da PIO basal de cerca de 25% durante o pico de ação, duas horas após a instilação, mantendo-se em cerca de 20%. A posologia recomendada é uma a duas instilações diárias (Shields et al., 1998).

As drogas pertencentes a essa classe são denominadas simpatolíticas, antagonistas β -adrenergicos ou beta-bloqueadores. O mais utilizado é o timolol, mas outros exemplos incluem betaxolol, levobunolol,

carteolol e metipranolol. O maleato de timolol 0,5% é a droga padrão, bloqueador não-seletivo dos receptores beta (β_1 e β_2), assim como carteolol, metipranolol e levobunolol. O betaxolol é o único beta-bloqueador β_1 seletivo (Zimmerman et al., 1977; Radius et al., 1978; Novak, 1987; Shields et al., 1998).

O betaxolol apresenta menores efeitos colaterais sobre o sistema respiratório, porém os efeitos cardíacos e oculares são semelhantes ao timolol e a ação hipotensora é reduzida em relação aos beta-bloqueadores não-seletivos (Shields et al., 1998; Costa et al., 2002).

Os beta-bloqueadores apresentam inúmeros efeitos colaterais sistêmicos, sendo que os mais pronunciados atingem o aparelho cardio-respiratórios (broncoespasmo e bradicardia) e o sistema nervoso central. Depressão, zumbido, fadiga, falha de memória e confusão mental, alteração da resposta à hipoglicemia em diabéticos e impotência sexual são efeitos colaterais sistêmicos também descritos com o uso de beta-bloqueadores. (Zimmerman et al., 1979 ; Sonntag et al., 1979 ; Berrospi et al., 1982 ; Reiss et al., 1983).

1.1.3. Inibidores da anidrase carbônica

1.1.3.1. Sistêmicos

Os inibidores da anidrase carbônica vêm sendo utilizados no tratamento clínico do glaucoma há mais de 40 anos. Inicialmente utilizados apenas na apresentação oral, são exemplos dessa classe a acetazolamida e metazolamida. A dose recomendada de acetazolamida (Diamox®) é de uma

cápsula de 125 mg ou 250 mg a cada 6 horas, e a dose máxima recomendada é de 1,0 g ao dia. O pico de ação ocorre 2 horas após a ingestão, com duração de até 6 horas. A acetazolamida tem como mecanismo de ação a inibição da enzima anidrase carbônica no epitélio do corpo ciliar, diminuindo a produção de humor aquoso sem atuar no seu escoamento. Dentre os efeitos colaterais induzidos pela acetazolamida podemos citar a acidose metabólica, fadiga, depressão, gosto metálico, gastrite, parestesias, perda de peso, formação de cálculo renal, entre outros (Becker, 1954; Lichter, 1981; Joyce et al., 1989).

Os intensos efeitos colaterais sistêmicos dos inibidores da anidrase carbônica motivaram o desenvolvimento de inibidores da anidrase carbônica tópicos. A utilização dos inibidores da anidrase carbônica sistêmicos destina-se hoje ao tratamento emergencial ou temporário do glaucoma, tendo seu uso crônico restrito.

1.1.3.2. Tópicos

Pertencem ao grupo de inibidores da anidrase carbônica tópicos a brinzolamida, na concentração de 1% e dorzolamida, na concentração de 2%, reduzindo a PIO por diminuir a produção de humor aquoso. Essas drogas promovem redução da PIO em 25 % da pressão basal e seu pico de ação ocorre duas horas após a instilação (Strahlman et al., 1995; Silver, 1996).

Pacientes usuários de inibidores tópicos da anidrase carbônica podem apresentar distorção do paladar (gosto metálico), há descrições de

borramento visual, além de irritação e ardência ocular (em menor intensidade na brinzolamida). Há relatos também de conjuntivite folicular e edema palpebral induzido por essas medicações tópicas. Nos usuários crônicos de inibidores da anidrase carbônica é possível observar aumento da espessura corneana (Strahlman et al., 1995; Silver, 1996; Tsukamoto et al., 2005).

A brinzolamida, por ter pH mais básico (7,5) que a dorzolamida (pH= 4,5), causa menor ardência (3% contra 16%). Entretanto, promove maior borramento visual por ser uma suspensão e não uma solução (3,6% contra 0,6%) (Costa et al., 2002). A brinzolamida e dorzolamida não apresentam os efeitos colaterais sistêmicos dos inibidores da anidrase carbônica utilizados por via oral (Balfour et al., 1997; Cvtkovic et al., 2003).

1.1.4 PROSTAGLANDINAS

1.1.4.1. Definição e histórico

As prostaglandinas, juntamente com leucotrienos, prostaciclina e tromboxano A₂, fazem parte do grupo dos eicosanóides, que são substâncias derivadas de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido araquidônico (Campbell e Halushka, 1996).

Os eicosanóides são produzidos a partir dos fosfolípidios em resposta a uma variedade de estímulos, não sendo encontrados pré-formados nos tecidos. São extremamente prevalentes, tendo sido detectados em praticamente todos os tecidos e fluidos do corpo humano (Rang et al., 2001). Os eicosanóides contribuem para o controle de vários processos fisiológicos

e patológicos, estando entre os mediadores e moduladores mais importantes da reação inflamatória (Rang et al., 2001).

Figura 1: Organograma demonstrando o ciclo do ácido araquidônico com a formação das prostaglandinas.

Foi na década de 30 que surgiram os primeiros relatos da ação dos eicosanóides. Em 1930, dois ginecologistas americanos, Kurzrok e Lieb¹ (*apud* Coleman et al., 1994), demonstraram que fragmentos de útero humano sofriam contração quando expostos ao líquido seminal humano. Poucos anos depois, Goldblatt² em 1933, na Inglaterra (*apud* Coleman et al., 1994), e Von Euler³ em 1934, na Suécia (*apud* Coleman et al., 1994), relataram contração da musculatura lisa uterina e dos vasos sangüíneos

¹ KURZROK, R.; LIEB, C.C. Biochemical studies of human sêmen. II. The action of semen on the human uterus. **Proc Soc Exp Biol Med**, 28: 268-72, 1930.

² GOLDBLATT, M.W. A depressor substance in seminal fluid. **J Soc Chem Ind Lond**, 52: 1056-7, 1933.

³ VON EULER, U.S. Some aspects of the actions of prostaglandins. **Arch Int Pharmacodyn Ther**; Suppl:295-307, 1934.

propiciada pelo líquido seminal e glândulas reprodutoras acessórias. Von Euler (1934) identificou a substância ativa como sendo um ácido lipossolúvel e a denominou prostaglandina, pois se acreditava que tinha origem na próstata.

1.1.4.2. Bioquímica

As famílias das prostaglandinas (PGs), leucotrienos e compostos relacionados são conhecidas como eicosanóides, pois são derivadas dos ácidos graxos essenciais com 20 átomos de carbono, que contém três, quatro ou cinco ligações duplas: ácido 8,11,14-eicosatrienóico (ácido diomo- γ -linolênico), ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (ácido araquidônico) (Figura 1) e ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (Campbell e Halushka, 1996). Na maioria dos animais, o ácido araquidônico é o precursor mais importante das PGs (Coleman et al., 1994), sendo derivado do ácido linoleico absorvido no intestino.

Duas décadas após sua descoberta, tornou-se claro que a PG representava uma família de substâncias e não apenas um composto (Rang et al., 2001). Bergström e Sjövall (1957) purificaram com sucesso as primeiras PGs, denominadas PGE_1 e $\text{PGF}_{1\alpha}$. Na década seguinte, observaram-se diferenças nas atividades biológicas das PGs, nomeadas alfabeticamente de PGA_2 a PGH_2 (Coleman et al., 1994).

As PGs das séries A, B e C são cetonas insaturadas com origem não enzimática da PGE durante o processo de extração. Por isso, são consideradas artefatos, sendo improvável sua ocorrência natural (Schneider et al., 1966; Horton, 1979; Campbell e Halushka, 1996). As PGs das séries D

e E são hidroxicetonas, enquanto as PGs F são 1,3-dióis; elas são produtos do metabolismo da PGG e PGH, que são endoperóxidos cíclicos. As PGs das séries G e H são intermediários instáveis na biossíntese dessa família de hormônios (Hamberg e Samuelsson, 1973).

Os grupos principais de PGs são subdivididos de acordo com o número de ligações duplas nas cadeias laterais, o que é indicado pelo número subscrito 1, 2 ou 3 e reflete, na maioria dos casos, o ácido graxo precursor. O ácido diomo- γ -linolênico é precursor da série 1, o ácido araquidônico da série 2 e o ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico da série três (Campbell e Halushka, 1996).

A diversidade dos efeitos das PGs pode ser explicada pela existência de receptores diferentes que efetuam suas ações. Os receptores são denominados de acordo com a PG natural com a qual eles têm maior afinidade e divididos em cinco tipos principais, designados DP (PGD), FP (PGF), IP (PGI₂), TP (TXA₂) e EP (PGE) (Coleman et al., 1994; Campbell e Halushka, 1996).

1.1.4.3. Mecanismo de ação

As PGs e seus derivados representam uma nova abordagem para o tratamento medicamentoso do glaucoma, pois são hormônios locais, ao contrário dos outros medicamentos utilizados, que são agonistas/antagonistas do sistema autonômico ou inibidores de enzimas que são estranhos ao organismo (Bito, 2001).

O mecanismo pelo qual as PGs reduzem a PIO não é o mesmo entre as diferentes espécies, provavelmente devido a diferenças anatômicas nas vias de drenagem do humor aquoso (Alm, 1998).

Estudos em primatas forneceram informações importantes sobre o mecanismo de ação das PGs, pois os componentes do sistema de drenagem do humor aquoso podem ser avaliados com precisão nesses animais, o que não ocorre em seres humanos. De acordo com Kaufman (1986), as PGE_1 , PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ não produzem efeito na drenagem através da malha trabecular (via convencional) em macacos.

A ausência de efeito da $PGF_{2\alpha}$ na via de drenagem convencional em olhos de macacos foi confirmada por diversos estudos, que também demonstraram que a $PGF_{2\alpha}$ não reduz a produção de humor aquoso (Crawford e Kaufman, 1987; Crawford et al., 1987; Gabelt e Kaufman, 1989; Nilsson et al., 1989; Gabelt e Kaufman, 1990). Tais achados reforçam a teoria de que a $PGF_{2\alpha}$ reduz a PIO principalmente, se não exclusivamente, por meio do aumento do escoamento pela via úveo-escleral.

A via de drenagem úveo-escleral foi descrita há cerca de 40 anos por Anders Bill (Bill, 1965; Bill e Hellsing, 1965). Bill (1965) observou que, em macacos, cerca de 50% do humor aquoso não deixava a câmara anterior através da malha trabecular e do canal de Schlemm. Utilizando injeção de albumina marcada na câmara anterior de macacos, evidenciou que apenas metade da albumina que saía da mesma podia ser recuperada no plasma. O restante da albumina foi encontrado no músculo ciliar, coróide, esclera e tecidos episclerais.

A via de drenagem úveo-escleral é caracterizada pela passagem do humor aquoso da câmara anterior pela raiz da íris e os espaços extracelulares no músculo ciliar. Como não há barreira epitelial entre a câmara anterior e o músculo ciliar, não há nada que evite a passagem do humor aquoso entre os feixes do músculo ciliar para os espaços supraciliar e supracoroidal (Alm et al., 1998), de onde flui através de poros na esclera para atingir o espaço subconjuntival.

Embora o mecanismo preciso para o aumento da drenagem úveo-escleral não esteja totalmente esclarecido, os análogos de PGs parecem ativar a cascata de transdução molecular e aumentar a síntese de metaloproteinases no corpo ciliar (Weinreb et al., 2002). A aplicação tópica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de seus análogos parece modificar o músculo ciliar, alargando e descomprimindo os espaços preenchidos por tecido conectivo entre os feixes musculares (Nilsson et al., 1989; Tamm et al., 1990) e remodelando a matriz extracelular (Weinreb et al., 1997; Ocklind, 1998; Sagara et al., 1999), aumentando dessa forma o escoamento úveo-escleral em primatas (Crawford et al., 1987; Gabelt e Kaufman, 1989) e humanos (Toris et al., 1993).

1.1.4.4. Análogos de prostaglandinas para o tratamento do glaucoma.

Devido ao comportamento agressivo e evolução devastadora da doença, há uma busca constante de novas moléculas que possam agir no controle da PIO que tenham maior potência hipotensora além de maior comodidade posológica. Na última década, foram desenvolvidas novas

medicações hipotensoras para o tratamento do glaucoma, dentre elas os análogos de prostaglandinas. Estas são a única classe de colírios antiglaucomatosos cuja potência hipotensora como monoterapia pode atingir 40% de redução da PIO basal. Sua posologia confortável (uma instilação diária) favorece a obediência ao tratamento (Linden et al., 2001).

Prostaglandinas, prostamidas e docosanóides fazem parte desse novo grupo de agentes utilizados para reduzir a PIO indicados para o tratamento de glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e hipertensão ocular (HO). Embora essas drogas sejam estruturalmente diferentes, elas compartilham características similares, incluindo o mecanismo de ação, sendo consideradas como análogos da PG (Alexander et al., 2002).

Há atualmente no mercado três tipos de análogos da PG destinados a reduzir a PIO: latanoprost (Xalatan[®] – Laboratórios Pfizer Ltda), travoprost (Travatan[®] – Alcon Laboratórios do Brasil Ltda) e bimatoprost (Lumigan[®] – Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda).

1.1.4.4. Latanoprost

A latanoprost é um análogo da PGF_{2α} (Figura 2), atuando como agonista seletivo do receptor prostanoide FP para reduzir a PIO (Alm e Villumsen, 1991). A solução de latanoprost 0,005% foi aprovada pelo FDA no dia 05 de junho de 1996 e pela ANVISA no Brasil em 1997, devendo ser utilizada apenas uma vez ao dia, no período noturno.

Em sua estrutura química, a hidroxila foi substituída ao final da cadeia alfa por um éster, com a finalidade de permitir uma maior penetração corneana. Na cadeia ômega, houve uma substituição por um grupo fenil com

intuito de aumentar a afinidade pelo receptor FP. Também houve uma saturação dos grupos carbono 14 e 15 com o objetivo de reduzir a hiperemia (Bernstein, 2003; Nguyen, 2004). (Figura 3).

Figura 2. Estrutura química da PGF 2α.

Figura 3: Estrutura química de latanoprost, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_5$.

A eficácia clínica de latanoprost utilizada como monoterapia foi bem estabelecida por diversos estudos. Em estudos multicêntricos, randomizados, duplo-mascarados, com duração de três a seis meses, envolvendo mais de 1000 pacientes com GPAA ou HO, o uso de latanoprost uma vez ao dia demonstrou ser mais eficaz que o uso de maleato de timolol 0,5% duas vezes ao dia (Alm e Stjernschantz, 1995; Camras, 1996; Mishima et al., 1996; Watson e Stjernschantz, 1996; Hedman e Alm, 2000).

Alm e Stjernschantz (1995) compararam o efeito da instilação de latanoprost uma vez ao dia (manhã ou noite) com maleato de timolol 0,5% duas vezes ao dia sobre a PIO em um estudo randomizado, duplo-mascarado, multicêntrico, com três grupos paralelos e seis meses de

duração. Duzentos e sessenta e sete pacientes foram randomizados: 84 para uso de timolol, 89 para uso de latanoprostá pela manhã por três meses e depois à noite por mais três meses, e 94 para esquema contrário com latanoprostá (três meses iniciais à noite, seguidos de três meses pela manhã). Após seis meses de estudo, evidenciou-se uma redução na PIO média ao longo do dia, aferida às 8:00, 12:00 e 16:00 horas, de 27% com timolol (24,6 para 17,9 mmHg), 31% com latanoprostá pela manhã (25,5 para 17,7 mmHg) e 35% com latanoprostá à noite (24,8 para 16,2 mmHg). A eficácia de latanoprostá utilizada à noite foi estatisticamente superior à latanoprostá instilada pela manhã e ao timolol ($p<0,001$).

Camras (1996) comparou a eficácia hipotensora ocular da latanoprostá com maleato de timolol 0,5% em um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-mascarado, com grupos paralelos, do qual participaram 268 pacientes com HO ou GPAA inicial que receberam latanoprostá uma vez ao dia ou timolol duas vezes ao dia durante seis meses. Ambos os medicamentos reduziram significativamente a PIO em relação aos valores basais ($p<0,001$), sem evidência de perda de eficácia ao longo do estudo. Aos seis meses, a redução da PIO obtida com latanoprostá ($6,7 \pm 3,4$ mmHg) foi significativamente maior que a obtida com timolol ($4,9 \pm 2,9$ mmHg) ($p<0,001$).

1.1.4.4.2. Travoprostá

A travoprostá também é um análogo da $\text{PGF}_{2\alpha}$, atuando como agonista seletivo do receptor prostanoide FP para reduzir a PIO (Sharif et al., 1999). A solução de travoprostá 0,004% foi aprovada pela ANVISA no Brasil em 2001 e pelo FDA no dia 16 de março de 2001, devendo ser utilizada apenas uma vez ao dia, no período noturno.

Em sua estrutura química, a hidroxila foi substituída ao final da cadeia alfa por um éster, com finalidade de permitir uma maior penetração corneana. Na cadeia ômega, houve uma substituição por um grupo fenil com intuito de aumentar a afinidade pelo receptor FP. Apresenta ainda a adição de um grupo flúor ao grupo fenil da cadeia ômega e a união entre os grupos carbono 14 e 15 não está saturada (Nguyen, 2004) (Figura 4).

Figura 4: Estrutura química de travoprostá, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{O}_6$.

Netland et al. (2001) avaliaram 800 pacientes com GPAA ou HO que foram distribuídos aleatoriamente para tratamento com travoprostá 0,0015%, travoprostá 0,004%, latanoprostá 0,005% ou maleato de timolol 0,5%. A eficácia e a segurança de travoprostá administrada uma vez ao dia foram comparadas à eficácia e a segurança da administração de latanoprostá uma vez ao dia e de maleato de timolol duas vezes ao dia, durante um período de 12 meses. No início do estudo, sem uso de medicação, a PIO média variou,

ao longo do dia, de 24,1 a 26,4 mmHg (travoprostá 0,0015%), de 24,5 a 26,8 mmHg (travoprostá 0,004%), de 24,9 a 26,9 mmHg (latanoprostá 0,005%), e de 24,6 a 27,0 mmHg (maleato de timolol 0,5%). Durante o estudo, a solução de travoprostá mostrou-se igual ou superior à solução de latanoprostá e superior ao maleato de timolol. A PIO média durante as visitas variou de 17,7 a 19,5 mmHg (travoprostá 0,0015%), de 17,5 a 19,7 mmHg (travoprostá 0,004%), de 17,9 a 19,5 mmHg (latanoprostá 0,005%), e de 19,1 a 20,7 mmHg (maleato de timolol 0,5%).

Goldberg et al (2001) realizaram um estudo randomizado, duplo-mascarado, com grupos paralelos e nove meses de duração para comparar a eficácia na redução da PIO de travoprostá 0,0015% e 0,004% uma vez ao dia com o maleato de timolol 0,5% duas vezes ao dia. Foram incluídos 573 pacientes com GPAA ou HO, que apresentavam PIO entre 24 e 36 mmHg às 9 horas e entre 21 e 36 mmHg às 11:00 e 16:00 horas durante duas visitas, após *washout* apropriado de outros medicamentos. A PIO foi aferida às 9:00, 11:00 e 16:00 horas no início do estudo e nas visitas subseqüentes. A PIO média foi significativamente menor com travoprostá 0,004% do que com timolol às 9 horas ($p=0,0246$), 11:00 horas ($p=0,0039$) e 16:00 horas ($p=0,0004$), sendo também menor que a obtida pela travoprostá 0,0015% às 11:00 horas ($p=0,0314$).

1.1.4.4.3. Bimatoprost

A bimatoprost tem sido descrita como uma prostamida (Woodward et al., 2001), embora apresente uma estrutura química similar à dos análogos da $\text{PGF}_{2\alpha}$. A solução de bimatoprost 0,03% foi aprovada pelo FDA no dia 16 de março de 2001 e pela ANVISA no Brasil também em 2001, devendo ser utilizada apenas uma vez ao dia, no período noturno.

Na solução de bimatoprost, a hidroxila foi substituída ao final da cadeia alfa por um grupo amida, sendo por isso considerada uma prostamida. Na cadeia ômega, houve substituição por um grupo fenil, além da união entre os grupos carbono 14 e 15 não estar saturada, permanecendo a dupla ligação (Nguyen, 2004). (Figura 5)

Figura 5: Estrutura química de bimatoprost, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_4$.

As prostamidas são amidas de ácidos graxos, derivadas da anandamida – um lípido que existe naturalmente na membrana celular. Elas são biossintetizadas a partir da anandamida através da via da ciclooxygenase-2 (Woodward et al., 2001).

Ao contrário dos outros medicamentos citados anteriormente, a bimatoprost adquire sua característica lipofílica pela presença de um radical etil-amida no carbono 1, e não um radical isopropil-éster (Woodward et al.,

2001). Além disso, de acordo com a teoria de Woodward et al. (2001), a bimatoprost não sofreria hidrólise no olho para se tornar um ácido livre, possuindo um mecanismo de ação que não incluiria a ligação a receptores FP. Apesar disso, um estudo recente demonstrou a ligação do ácido livre da bimatoprost ao receptor prostanóide FP (Sharif et al., 2001).

Um estudo clínico multicêntrico (Sherwood e Brandt, 2001), randomizado e duplo-mascarado foi realizado para comparar a eficácia de bimatoprost uma vez ao dia (n=474) ou duas vezes ao dia (n=483) com o maleato de timolol 0,5% duas vezes ao dia (n=241). O uso de bimatoprost uma vez ao dia resultou em redução da PIO significativamente maior que o maleato de timolol durante todo o estudo. Aos seis meses de estudo, às 10:00h, evidenciou-se uma redução de 8,1 mmHg (33%) com bimatoprost uma vez ao dia e de 5,6 mmHg (23%) com maleato de timolol duas vezes ao dia ($p \leq 0,029$). A administração de bimatoprost duas vezes ao dia apresentou eficácia similar ou superior ao maleato de timolol, porém foi menos eficaz que a posologia de uma vez ao dia.

1.1.4.5 Efeitos colaterais dos análogos da prostaglandina

Em relação a efeitos colaterais sistêmicos, os análogos da PG parecem ser drogas seguras, embora esta observação necessite de confirmação através de resultados de estudos a longo prazo. Podem provocar efeitos adversos leves a moderados incluindo náusea, dor abdominal, tontura, fadiga, ondas de calor, sudorese, ansiedade e cefaléia. (Watson et al., 1996; Easthope et al., 2002; Novak et al., 2002; Perry et al.,

2003). Há relatos raros de angina, hipertensão arterial e taquicardia. (Hoyng et al., 2000; Higginbotham et al., 2002; Abib, 2003).

Os análogos da PG podem alterar a coloração do olho, aumentando a quantidade de pigmento da íris, particularmente em pacientes com íris de cor mista, isto é, azul acastanhado, cinza acastanhado, verde acastanhado ou amarelo acastanhado (Alm e Stjernschantz, 1995; Camras, 1996). Essa alteração da cor da íris é causada por um aumento do conteúdo de melanina nos melanócitos do estroma iriano, sendo aparentemente permanente, embora não exista aumento da pigmentação após a interrupção do tratamento. Em macacos, as PGs de ocorrência natural como $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 também induzem aumento da pigmentação da íris, indicando que esse fenômeno é um efeito comum às PGs (Selen et al., 1997).

Alterações dos cílios também são associadas ao uso de análogos da PG. Estas alterações incluem crescimento dos cílios, aumento da densidade e/ou espessura e até mesmo alterações da coloração (Johnstone, 1997; Kook, 2000). Chen et al. (2004) descreveram sete casos de poliose associados ao uso tópico de bimatoprost, latanoprost e travoprost, dos quais seis apresentavam hipertricose associada.

Entre os mais sérios efeitos colaterais induzidos pelos análogos da PG estão a quebra da barreira hemato-aquosa e o desenvolvimento de edema macular cistóide (EMC) (Ayyala et al., 1998; Warwar et al., 1998; Miyake et al., 1999; Moroi et al., 1999; Lima et al., 2000; Wand e Gaudio, 2002; Wand e Shields, 2002; Watanabe et al., 2003; Arcieri et al., 2005). Embora existam alguns relatos de EMC e uveíte anterior associados ao uso

de latanoprostá em pacientes pseudofácicos e afácicos (Ayyala et al., 1998; Warwar et al., 1998; Miyake et al., 1999; Moroi et al., 1999; Lima et al., 2000; Watanabe et al., 2003), a incidência desses efeitos adversos é desconhecida. Existem também descrições de EMC documentado através de retinografia fluorescente em pacientes glaucomatosos submetidos à cirurgia de catarata associado à ausência ou ruptura da cápsula posterior e que haviam iniciado terapia medicamentosa com bimatoprostá, travoprostá ou unoprostá (Wand e Gaudio, 2002; Arcieri et al., 2005).

Além dos efeitos colaterais sistêmicos e locais já descritos anteriormente, o uso crônico de medicações tópicas antiglaucomatosas pode causar distúrbios da superfície ocular como alergia, ceratite puntata e olho seco (Shields et al., 1996).

2. EFEITOS DAS MEDICAÇÕES ANTIGLAUCOMATOSAS SOBRE A SUPERFÍCIE OCULAR

Em pacientes tratados com medicação tópica, a conjuntiva age como uma membrana semipermeável que, juntamente com a córnea, permite a absorção das drogas hipotensoras oculares. Por outro lado, a conjuntiva responde às agressões com inflamação, cicatrização, queratinização e neovascularização (Brandt et al., 1991).

2.1. Anatomia Conjuntival

A conjuntiva é formada por duas porções: a bulbar, em contato com o globo e fracamente aderida à cápsula de Tenon, e a palpebral, que recobre as pálpebras e está firmemente aderida ao tarso (Krachmer et al., 1997).

Figura 6: Fotomicrografia com aumento de 400 x demonstrando conjuntiva bulbar (seta à esquerda) e palpebral (seta à direita). Coloração HE. Fonte: Krashmer e Spalton, 1996.

Na superfície conjuntival podem-se observar células conjuntivais não-secretoras e secretoras. As células conjuntivais não-secretoras são oriundas do epitélio colunar estratificado. Sua morfologia pode variar conforme sua camada de origem. As células das camadas basais possuem o núcleo ovalado com pouco citoplasma e coloração basofílica (azul forte). As da camada intermediária são cilíndricas ou piramidais, com núcleo na posição excêntrica, de forma ovalada ou arredondada, e citoplasma de coloração basofílica. As células superficiais são poligonais com núcleo central e apresentam sinais de degeneração, com rarefação de cromatina e diminuição de volume. O citoplasma destas células apresenta sinais de queratinização com coloração eosinofílica. A queratinização é identificada

em seu estágio inicial pela presença de citoplasma com coloração pálida ou esmaecida e núcleo com alterações degenerativas como cariopícnose. Quando a queratinização é completa, observa-se ausência de núcleo (Tomimatsu e Belfort Jr, 1996).

Figura 7: Células conjuntivais da camada basal epitelial coradas por Leishman em lâmina proveniente de raspado conjuntival. As setas apontam o núcleo ovalado característico desta camada. Fonte: Dra. Lismary Mesquita.

As células epiteliais secretoras são as células caliciformes, mucossecretoras, que correspondem a 10% das células do epitélio conjuntival. São mais numerosas próximo à conjuntiva tarsal e bulbar inferonasal. São células grandes com citoplasma abundante e núcleo deslocado para a periferia em forma de anel de sinete, devido ao grande vacúolo citoplasmático preenchido por mucina (Tomimatsu e Belfort Jr, 1996).

Figura 8: Células caliciformes (setas) provenientes de biópsia conjuntival coradas por PAS. Aumento de 200x. Fonte: Dra. Ruth Santo.

O suprimento sanguíneo da conjuntiva palpebral é o mesmo das pálpebras, ou seja, deriva dos ramos faciais da artéria carótida externa (facial, superficial, temporal e infraorbital) e de ramos da artéria oftálmica (dorsal, nasal, frontal, supra-orbital e lacrimais), derivados da artéria carótida interna. O suprimento da conjuntiva bulbar deriva das artérias ciliares anteriores, ramos da artéria oftálmica. A inervação sensorial dá-se através dos ramos lacrimal, supra-orbital, supratroclear e infra-orbital, ramos da divisão oftálmica do V par craniano (Krachmer, Mannis e Holland, 1997).

2.2.Técnicas para avaliação da conjuntiva

2.2.1. Biópsia conjuntival

Trata-se de procedimento realizado em casos de conjuntivite crônica ou desordens incomuns como penfigóide cicatricial, síndrome oculoglandular de Parinaud, ceratoconjuntivite límbica superior e tumores linfóides conjuntivais. É contra-indicada em pacientes com glaucoma devido à indução de cicatrização e fibrose no local, o que pode comprometer o sucesso de uma futura cirurgia filtrante (Singh et al., 2005).

A biópsia conjuntival permite a avaliação de camadas superficiais e profundas, incluindo o estroma conjuntival, onde podemos observar a presença de vasos e existência ou não de infiltrado inflamatório. A biópsia conjuntival realiza-se sob instilação de colírio anestésico na região perilímbica, preferencialmente superior, para que a pálpebra superior proteja posteriormente o sítio do procedimento. Utiliza-se tesoura de Westcott para dissecação da amostra, em geral não maior que 5 mm x 5mm. Após obtenção da amostra, utilizam-se antibióticos e anti-inflamatórios tópicos (Krashmer et al.,1997).

O material pode ser fixado em soluções distintas conforme o destino do material: formalina (para histologia), glutaraldeído (microscopia eletrônica) e solução salina (para congelação ou imunohistoquímica). (Wilhelmus et al., 2000). Quanto às colorações, pode-se utilizar o método de hematoxilina-eosina (HE), principal técnica de coloração de tecidos para estudo de histologia básica. A hematoxilina é basófila, ou seja, tem afinidade

por substâncias básicas. Assim, ela costuma corar o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso, locais onde há grande quantidade de proteínas (básicas pelo seu grupamento amina). A eosina é acidófila, tendo afinidade pelo citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias ácidas das células (Wilhelmus et al., 2000).

A presença de polissacarídeos ou muco pode ser determinada pela técnica do PAS (Periodic Acid-Schiff), que permite identificar polissacarídeos simples ou associados a proteínas (Krachmer et al., 1997).

2.2.2. Citologia conjuntival ou esfregaço conjuntival

Para obtenção do material destinado à citologia conjuntival, utiliza-se a espátula de Kimura ou utiliza-se uma pequena escova (“citobrush”). Após a coleta do material, este é imediatamente disposto sobre uma lâmina de vidro ou colocado em solução tamponada contendo papel filtro, que absorverá as células sobrenadantes. A fixação é feita rapidamente para evitar ressecamento do material e, empregando-se colorações como GIEMSA ou PAS, é possível observar células caliciformes e um grande número de células epiteliais queratinizadas e também desorganizadas, pois o raspado quebra as junções celulares existentes no epitélio. Debris celulares e muco também podem ser observados (Scarpi, 1996; Tseng, 1985).

Figura 9: Células conjuntivais com aumento do núcleo provenientes de raspado conjuntival coradas por GIEMSA, aumento 400x. As setas representam os núcleos. Fonte Dra. Lismary Mesquita.

2.2.3. Citologia de impressão

A citologia de impressão utiliza o acetato de celulose (papel filtro) para colheita de material, posicionando a face rugosa do filtro milipore sobre a conjuntiva, que é pressionada com um bastão de vidro por alguns segundos (Tseng, 1985; Kraschmer et al., 1997).

Figura 10: Método de coleta de citologia de impressão, utilizando-se papel filtro. Fonte: Kraschmer, 1997.

Para detectar alterações celulares como queratinização e aumento na estratificação celular e avaliar a densidade de células caliciformes, utilizam-se as mesmas colorações utilizadas na biópsia conjuntival: hematoxilina – eosina e PAS (Scarpi, 1996). Este procedimento pode ser considerado uma biópsia não-invasiva, possibilitando mapear alterações topográficas celulares e anormalidades de superfície conjuntival (Tseng, 1985; Singh et al., 2005).

Figura 11: Lâmina proveniente de citologia de impressão da superfície epitelial conjuntival, demonstrando células com núcleo picnótico e arquitetura poligonal (seta). Fonte Krashmer, 1997.

2.3. EFEITOS INDUZIDOS PELAS DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DO GLAUCOMA SOBRE A SUPERFÍCIE OCULAR

Sendo o glaucoma uma doença crônica e progressiva, o tratamento geralmente compõe-se de associação medicamentosa para o controle da PIO. Grande parte dos estudos existentes abordam as alterações de superfície ocular induzidas por essa associação, porém apresentaremos na

seqüência as possíveis alterações induzidas pelos fármacos individualmente.

2.3.1. Agentes autonômicos colinérgicos

2.3.1.1. Pilocarpina

O uso tópico da pilocarpina relaciona-se a alterações graves da superfície ocular conjuntival, podendo causar quadro extremo de penfigóide cicatricial (Fiore et al., 1987), além de alergia na região palpebral e conjuntival e hipersensibilidade induzida pela toxicidade, cursando com conjuntivite folicular (Jackson, 1993).

2.3.1.2. Carbacol

O carbacol, quando usado para tratamento tópico do glaucoma, tem efeitos colaterais locais similares aos causados pelo uso da pilocarpina, porém em menor intensidade. Presume-se que isso ocorra em razão da menor penetração corneana do carbacol (Hung et al., 1982; Shields et al., 1998). Seu uso intra-cameral após cirurgia de catarata pode induzir edema corneano transitório (Zimmerman et al., 1989).

2.3.1.3. Iodeto de ecotiofato

Há relatos de pseudopenfigóide ocular (Patten et al., 1976) e dermatite de contato periorbital alérgica relacionada ao uso tópico de iodeto de ecotiofato (Mathias et al., 1979). Sugere-se que exista maior toxicidade ao epitélio corneano induzida pelo ecotiofato do que com uso de pilocarpina e carbacol (Shields et al., 1998).

2.3.2. Agentes autonômicos adrenérgicos

2.3.2.1. Epinefrina

O uso crônico de epinefrina está relacionado a efeitos colaterais locais marcantes como ardência e queimação à instilação, hiperemia conjuntival rebote ou reativa, pigmentação adenocrômica da conjuntiva, alergia (23,5%), conjuntivite folicular e blefarite (Cashwell et al., 1977, Shields et al., 1998).

Ainda são descritas reações como epidermalização do ponto lacrimal (Romano et al, 1973) e madarose (perda dos cílios) (Kass et al., 1972).

2.3.2.2. Dipivefrina

A dipivefrina apresenta vantagens em relação à epinefrina quanto aos efeitos colaterais locais, incluindo menor queimação e irritação à instilação (Yablonski et al., 1977). Porém, os demais efeitos tópicos induzidos pela epinefrina, como conjuntivite folicular e alergia, estão presentes na mesma intensidade, uma vez que a dipivefrina é uma pró-droga da epinefrina (Wandel et al., 1981; Liesegang et al., 1985).

2.3.2.3. Alfa-agonistas

2.3.2.3.1. Apraclonidina

A apraclonidina, um derivado da clonidina (*para-aminoclonidina*), apresenta como efeito colateral local mais importante o aparecimento de conjuntivite folicular, associado ou não a dermatite de contato, sendo observada em até 48% dos pacientes, mesmo em uso de baixas doses (0,125% ou 0,25%) (Wilkerson et al., 1991; Butler et al., 1995).

2.3.2.3.2. Clonidina

Os efeitos colaterais sobre superfície ocular causados pela clonidina são semelhantes aos induzidos pela apraclonidina (vide item anterior).

2.3.2.3.3. Brimonidina

A brimonidina, mais recente integrante da classe dos alfa-agonistas, apresenta como efeito colateral local a hiperemia ocular, cuja incidência varia de 11,4% a 26,3% (Adkins e Balfour, 1998), além de ardência ou queimação ocular (24%) e alergia ocular (blefarite, blefaroconjuntivite e conjuntivite folicular), cuja incidência varia de 4,2% a 11,5% (Adkins e Balfour, 1998; Katz et al., 1999; Melamed et al., 2000). Esses efeitos são menos freqüentes se comparados àqueles induzidos pela apraclonidina.

2.3.2.4. Beta-bloqueadores

Reações de toxicidade ocular após o uso de beta-bloqueador são incomuns, porém reações alérgicas e penfigóide cicatricial foram reportados (Tauber et al., 1989; Fiore et al., 1987). Ardência e hiperemia conjuntival frequentemente associados com ceratite puntata e anestesia corneana foram descritos, além de alterações nas camadas do filme lacrimal, com redução da produção lacrimal (McMahon et al., 1979; Van Burskirk, 1979, Weissman et al., 1990), produzindo sinais e sintomas de olho seco, queimação (6 a 9% com timolol, contra 30% com betaxolol) e blefaroconjuntivite alérgica (Weissman et al., 1990).

Os efeitos de alteração da produção lacrimal foram descritos em inúmeros estudos. (Herreras et al., 1992; Nuzzi et al., 1998; Thygesen et

al.,2000). Herreras e colaboradores (1992) associaram o uso prolongado (acima de 6 meses) de maleato de timolol 0,5% à maior incidência de olho seco, caracterizado por redução dos valores do teste de Schirmer e do teste de rotura do filme lacrimal ("break up test"). Além disso, o mesmo estudo empregou citologia de impressão, que demonstrou redução das células caliciformes, justificando sintomas relacionados à ceratoconjuntivite sicca.

Outros estudos sugerem que o timolol induza inflamação crônica na conjuntiva, aumento da proliferação fibroblástica, aumento da densidade de colágeno subepitelial, diminuição de células caliciformes e metaplasia do epitélio conjuntival (Brandt et al.,1991; Williams et al.,1992; Baudouin et al.,1998; Mietz et al.,2001).

2.3.3. Inibidores tópicos da anidrase carbônica

Os inibidores tópicos da anidrase carbônica apresentam alguns efeitos colaterais locais, incluindo irritação e ardência ocular à instilação, mais intensa com o uso de dorzolamida 2% (63%) quando comparado a brinzolamida 1% (20%) (Tsukamoto et al., 2005). Há descrição de aumento da espessura corneana secundário ao uso de inibidores tópicos da anidrase carbônica (Cvtkovic et al, 2003, 1997). Conjuntivite folicular e edema palpebral foram também descritos com o uso de tais fármacos (Balfour et al., 1997; Cvtkovic et al., 2003).

2.3.4. Análogos de prostaglandinas

Os efeitos colaterais oculares associados ao uso dos análogos da PG incluem hiperpigmentação da pele periocular, prurido, ardor, queimação,

sensação de corpo estranho, eritema palpebral, irritação ocular, astenopia e turvação visual, conjuntivite alérgica, ceratite puntata superficial, fotofobia, quemose, blefarite, erosão corneana, olho seco e lacrimejamento, além do agravamento de ceratite por herpes simples (Nordmann et al., 2002; Waugh e Jarvis, 2002; Easthope e Perry, 2002; Perry et al., 2003).

Dentre os efeitos colaterais locais relatados após o uso de análogos de PGs, a hiperemia conjuntival é o mais freqüente, podendo estar presente em até 50% dos usuários, dependendo da droga utilizada (Feldman et al., 2003).

A hiperemia conjuntival pode levar o paciente a interromper o tratamento (Alm, 1998; Netland et al., 2001; Eisenberg et al., 2002; Sponsel et al., 2002; Parrish et al., 2003).

Latanoprostá é o análogo que apresenta os menores índices de hiperemia conjuntival (12 a 28%) quando comparado à bimatoprostá (36 a 45 %) e travoprostá (35 a 50 %) (Gandolfi et al., 2001; Netland et al., 2001; Noeckers et al., 2003; Parrish et al., 2003; Feldman et al., 2003; Arcieri et al., 2005).

Stewart e colaboradores (2003) compararam o grau de hiperemia conjuntival em 28 indivíduos normais após exposição curta (5 dias) à latanoprostá, bimatoprostá e travoprostá utilizando registro fotográfico na lâmpada de fenda para comparação entre os grupos. O estudo sugeriu que latanoprostá induziu menor grau de hiperemia conjuntival em indivíduos normais ($p=0,04$).

A hiperemia conjuntival secundária ao uso de análogos de PGs, além de provocar desconforto estético, dificulta a aceitação do tratamento. Postula-se que a mesma seja decorrente de processo inflamatório conjuntival, desencadeado pela composição química dos medicamentos ou ainda que seja secundária a uma vasodilatação, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão elucidados.

2.3.5.O papel dos conservantes

Estudos anteriores com pacientes que receberam tratamento medicamentoso tópico prolongado mostraram que tanto as drogas hipotensoras quanto o conservante comum a elas (cloreto de benzalcônio) aumentam o número de células inflamatórias e fibroblastos na substância própria da conjuntiva e diminuem o número de células caliciformes, induzindo alterações da superfície ocular que se traduzem em olho seco. Descreveu-se uma ação indireta no filme lacrimal ou ainda uma ação deletéria tóxica direta ao epitélio dose-dependente pelo cloreto de benzalcônio (Mietz et al., 1994; De Saint Jean et al., 1999; Mietz et al., 2001; Cvenkel e Ihan, 2002; Hamard et al., 2003). Altas concentrações de cloreto de benzalcônio estão associadas em estudos *in vitro* à redução da viabilidade celular e indução de apoptose (Pisella, 2004, Guenoum, 2005).

2.4. CONSEQUÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES CONJUNTIVAS SOBRE O SUCESSO DA CIRURGIA FILTRANTE

Há evidências crescentes de que as medicações antiglaucomatosas tópicas afetam adversamente a superfície ocular e influenciam negativamente o resultado da cirurgia filtrante (Addicks et al., 1983; Lavin et al., 1990; Brandt et al., 1991; Prata Junior e Reis, 1993; Baudouin et al., 1994; Broadway et al., 1994). Sugere-se que uma reação inflamatória conjuntival crônica induzida pelas medicações exacerbaria o processo cicatricial, fato pouco desejável após a realização de uma cirurgia filtrante.

Lavin (1990), em estudo retrospectivo com 47 pacientes submetidos a trabeculectomia, comparou a taxa de sucesso da cirurgia em pacientes tratados com colírios por tempo curto antes da cirurgia (menos de duas semanas) com pacientes tratados por mais de um ano com terapia múltipla. A taxa de insucesso foi significativamente maior no grupo submetido a tratamento múltiplo (20,9%) ($p=0,001$) do que no grupo tratado por menos de duas semanas (2%). A falência ocorreu em média três meses após o procedimento, e o período de seguimento médio foi 27 meses em ambos os grupos.

Prata Junior e Reis (1993), em análise retrospectiva de 284 trabeculectomias realizadas em pacientes com glaucomas primários, analisaram o sucesso da cirurgia filtrante em pacientes usuários crônicos de medicação antiglaucomatosa tópica (média de $26,5 \pm 20$ meses) comparado à pacientes virgens de tratamento. Constataram maior taxa de sucesso (96,3%) no grupo que não foi tratado anteriormente do que no grupo

submetido a tratamento tópico prolongado (83,9%), com diferença estatisticamente significativa, sugerindo que o uso de medicações pode predispor ao insucesso da cirurgia.

Broadway (1994) avaliou 124 pacientes submetidos a trabeculectomia seguidos por pelo menos seis meses. Os pacientes foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento anterior: grupo A (sem medicação ou usuários de colírios por período menor que seis meses), grupo B (beta-bloqueador), grupo C (beta-bloqueador associado a miótico) e, grupo D (beta-bloqueadores, mióticos e simpaticomiméticos). A taxa de sucesso do grupo de usuários de beta-bloqueadores (93%) foi similar ao grupo que usou medicação por tempo curto (90%), e maior que as taxas de sucesso do grupo beta-bloqueador + mióticos (72%) e dos usuários de três medicações (beta-bloqueador, miótico e simpaticomimético) (45%). O autor concluiu que o uso prolongado de medicações antiglaucomatosas tópicas constitui fator de risco para falência de trabeculectomia.

2.5. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios com pacientes glaucomatosos que receberam tratamento medicamentoso tópico mostraram que tanto os agentes hipotensivos quanto seu conservante (cloreto de benzalcônio) causam aumento do número de células inflamatórias e fibroblastos na substância própria da conjuntiva e reduzem o número de células caliciformes, induzindo alterações da superfície ocular como olho seco. A duração do tratamento e a quantidade de medicação administrada estão relacionadas com a gravidade dos efeitos colaterais. Além disso, existem evidências crescentes sugerindo

que estas alterações podem aumentar o risco de falência da trabeculectomia. Entretanto, grande parte da informação neste tópico foi publicada antes do advento dos análogos de prostaglandinas.

Devido ao uso crescente dos análogos das prostaglandinas e à escassez de estudos que avaliem as alterações conjuntivais induzidas pelos mesmos, devido à necessidade de esclarecimento dos mecanismos envolvidos na gênese da hiperemia conjuntival induzida por essas medicações, houve interesse em desenvolver o presente estudo, que visa estudar as alterações conjuntivais induzidas por análogos das prostaglandinas (latanoprost 0,005%, bimatoprost 0,03% e travoprost 0,004%).

2.6. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar a reação inflamatória na conjuntiva de coelhos submetidos a tratamento ocular tópico com latanoprost 0,005%, bimatoprost 0,03%, travoprost 0,004%, maleato de timolol 0,5% e lubrificante contendo cloreto de benzalcônio como conservante.

2. Avaliar a proliferação vascular na conjuntiva de coelhos submetidos a tratamento ocular tópico com latanoprost 0,005%, bimatoprost 0,03%, travoprost 0,004% , maleato de timolol 0,5% e lubrificante contendo cloreto de benzalcônio como conservante.

3. Avaliar as células calciformes na conjuntiva de coelhos submetidos ao tratamento ocular tópico com latanoprost 0,005%, bimatoprost 0,03%,

travoprostá 0,004% , maleato de timolol 0,5% e lubrificante contendo cloreto de benzalcônio como conservante.

4. Avaliar o epitélio da conjuntiva de coelhos submetidos ao tratamento ocular tópico com latanoprostá 0,005%, bimatoprostá 0,03%, travoprostá 0,004% , maleato de timolol 0,5% e lubrificante contendo cloreto de benzalcônio como conservante.

5. Avaliar as regiões subepitelial e estromal na conjuntiva de coelhos submetidos ao tratamento ocular tópico com latanoprostá 0,005%, bimatoprostá 0,03%, travoprostá 0,004%, maleato de timolol 0,5% e lubrificante contendo cloreto de benzalcônio como conservante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental, que incluiu cinqüenta coelhos albinos da raça Nova Zelândia (*oryctolagus cuniculus*), foi realizado no Centro de Cirurgia Experimental do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, localizado no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Os animais foram mantidos no biotério dessa instituição em viveiros padrão para coelhos, ou seja, acomodados em gaiolas (dez coelhos por gaiola), alimentados com uma dieta regular sem restrições em relação à quantidade de comida ou água consumidas. A temperatura ambiente era de aproximadamente 20º (18 a 23º) e os animais foram mantidos sob ciclo controlado de 12 horas em ambiente claro sob iluminação de lâmpadas fluorescentes e 12 horas em ambiente escuro. A instilação dos colírios foi realizada às 17 horas, período que antecedia o início do ciclo noturno dos animais.

3.1. Critérios de inclusão

Incluíram-se no estudo apenas animais do sexo feminino em torno de 90 dias, com peso entre 1750g e 2300g, saudáveis e sem alterações oculares detectáveis ao exame externo. Todos os animais foram vacinados previamente com um acaricida e endoparasiticida denominado Ivomec® (0,5 ml) (Ivermectina, Merial Brasil, Campinas, São Paulo, Brasil) e tomaram complemento vitamínico ADE (0,5 ml) (Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil), segundo as normas do biotério.

3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos animais de sexo masculino e idade acima de 90 dias e com peso fora da faixa estabelecida. Os animais portadores de doenças sistêmicas e/ou oculares foram excluídos do estudo.

3.3. Constituição dos grupos

Os grupos foram constituídos aleatoriamente, alocando populações de 10 animais em cada grupo tratado com latanoprost 0,005% (Xalatan® - Laboratórios Pfizer Ltda), bimatoprost 0,03% (Lumigan® - Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil), travoprost 0,004% (Travatan® - Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), maleato de timolol 0,5% (Timoptol-XE® - Merck Sharp & Dohme- Brasil, São Paulo, Brasil) e colírio lubrificante composto por hipromelose e dextrana 70 (Lacribell®, Latinofarma, São Paulo, Brasil) contendo cloreto de benzalcônio como conservante. A concentração de cloreto de benzalcônio nos colírios utilizados está descrita a seguir: latanoprost 0,02%, bimatoprost 0,005%, travoprost 0,015%, maleato de timolol 0,01% e lubrificante 0,006%.

Todas as medicações testadas foram instiladas na posologia de uma gota ao dia por 30 dias às 17 horas. O olho esquerdo de cada coelho foi submetido a tratamento, enquanto os olhos direitos formaram o grupo controle.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Biópsia conjuntival

Com o objetivo de avaliar alterações histológicas iniciais, após um período de oito dias de tratamento, cinco coelhos de cada grupo (com exceção do grupo CBA) foram sedados, e ambos os olhos de cada coelho foram submetidos à biópsia conjuntival às 14 horas, 21 horas após a instilação da última gota de colírio. A anestesia foi obtida com administração parenteral de Cloridrato de Cetamina (KETALAR®, laboratório Ache, Guarulhos, São Paulo, Brasil), na dose de 50 mg/kg, associado ao Cloridrato de Xilazina (ROMPUM®, laboratório Bayer SA- Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dose de 2 mg/kg, na mesma seringa, ambos por via intramuscular. Os animais não sofreram eutanásia.

No trigésimo dia de tratamento, os cinco animais restantes de cada grupo, juntamente aos coelhos do grupo tratado com cloreto de benzalcônio, foram submetidos à biópsia conjuntival.

3.4.1.1. Técnica cirúrgica

Após antissepsia com iodo povidine 10% tópico (solução diluída em solução salina 0,9%) e colocação de blefarostato, realizou-se biópsia conjuntival profunda na região límbica superior às 12 horas. Um fragmento conjuntival quadrangular com dimensões de 5 mm x 5 mm (medidos com compasso cirúrgico) foi retirado utilizando-se tesoura de Westcott e pinça de conjuntiva serrilhada.

Figura 12: Imagem do centro cirúrgico do Centro de Estudos Experimentais do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba durante procedimento de biópsia dos coelhos.

Figura 13: Foto do procedimento cirúrgico (biópsia conjuntival), conforme descrito na técnica cirúrgica.

3.4.2. Pós-operatório

Imediatamente após a realização das biópsias, os animais sofreram instilação de associação comercial fixa de antibiótico e antiinflamatório (Cloridrato de Ciprofloxacina 0,3% e Dexametasona 0,1% (Cilodex®, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) na posologia de 4 gotas ao dia durante 24 horas antes de serem excluídos do estudo).

3.4.3. Preparação do material para histologia e coloração

Os fragmentos conjuntivais foram fixados em formol a 10% e os cortes preparados em blocos de parafina. Imediatamente após a coleta dos tecidos conjuntivais, estes foram imersos no fixador e mantidos à 4°C por 24 a 48 horas. Durante o processamento histo-técnológico, as amostras de tecido conjuntival foram processadas pelas técnicas rotineiras de inclusão

em parafina, através de desidratação em séries crescentes de etanóis (de 50 a 100%) com infiltração em resina e álcool. Realizaram-se cortes com espessura de 5µm, empregando-se o micrótomo Leica RM 2155 (Leica Microsystems, Wetzlar- Alemanha). Os cortes foram então coletados, montados em “slides” de vidro (dois “slides” por biópsia) e corados com hematoxilina/eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS).

Nas lâminas empregadas para avaliação e quantificação de processo inflamatório, contagem de número de vasos, medida do diâmetro vascular e espessura do epitélio, utilizou-se a coloração de HE com um aumento de 400 vezes. A coloração de PAS foi empregada para avaliação das células caliciformes.

3.4.4. Análise qualitativa do infiltrado inflamatório

Em seguida, procedeu-se análise qualitativa para avaliação da intensidade do infiltrado de células inflamatórias por campo, escolhidos aleatoriamente, tendo sido avaliados três campos por lâmina.

A análise do infiltrado de células inflamatórias foi realizada de maneira qualitativa por um examinador mascarado para o grupo analisado. Classificou-se o infiltrado inflamatório em ausente, leve, moderado e intenso, de acordo com as figuras 15, 16 e 17.

O Image Pro-Plus não foi utilizado para avaliação do parâmetro infiltrado inflamatório porque a contagem das células pelo programa baseia-se na determinação da coloração da estrutura a ser contada. A definição de cor dos leucócitos assemelha-se à cor do núcleo de outras células (por

exemplo, fibroblastos e epitélio conjuntival) bem como à cor de outras estruturas não-nucleares.

Figura 14: Fotomicrografia com aumento de 400x demonstrando infiltrado inflamatório leve na conjuntiva de coelho, coloração HE.

Figura 15: Fotomicrografia com aumento de 400 x mostrando infiltrado inflamatório moderado da conjuntiva de coelho , coloração HE.

Figura 16: Fotomicrografia com aumento de 400 x mostrando infiltrado inflamatório intenso e difuso da conjuntiva , coloração HE.

3.4.5. Avaliação histomorfométrica

Para a análise histo-morfométrica, os campos histológicos das lâminas coradas com HE e PAS foram fotografados (capturados digitalmente) por câmera digital (Sony, P100, Sony Brasil, Manaus, Brasil) acoplada ao programa de computador Image Pro-Plus versão 4 (IP4) (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) para a aquisição das imagens e realização da histomorfometria. O Image Pro-Plus captura digitalmente as imagens histológicas provenientes de um microscópio óptico. Por meio de ferramentas virtuais (régua virtuais), o operador pode medir estruturas, contar células, mensurar áreas e localizar estruturas celulares de mesma coloração para posterior contagem ou mensuração.

Os seguintes parâmetros foram avaliados em dois segmentos pré-delimitados aleatoriamente, com auxílio da régua virtual do programa de computador, cada um deles compreendendo 200 μm de comprimento de epitélio conjuntival:

- 1) espessura do epitélio conjuntival em μm (micrômetro);
- 2) contagem de células caliciformes;
- 3) contagem de número de vasos;
- 4) medida do diâmetro vascular em μm (micrômetro).

Figura 17: Fotografia demonstrando o funcionamento do programa de computador Image Pro-Plus. Na foto, observa-se a régua virtual de 200 micra e contagem de células caliciformes. Imagem referente ao grupo tratado com bimatoprost a os 30 dias.

Figura 18: Fotografia demonstrando o funcionamento do programa de computador Image Pro-Plus. Na foto, observa-se a régua virtual de 200 micra (seta), mensuração da espessura epitelial e medida do diâmetro vascular. Imagem referente ao grupo tratado com maleato de timolol aos 8 dias.

Figura 19: Fotografia demonstrando funcionamento do programa de computador Image Pro-Plus. Na foto, observa-se a mensuração da espessura epitelial e medida do diâmetro vascular em aumento de 400x. Imagem referente ao grupo tratado com travoprost a os 8 dias.

3.5. Aspectos éticos

Os procedimentos utilizados na pesquisa seguiram as normas do estatuto para uso de animais em pesquisa em oftalmologia e visão da ARVO.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, onde o estudo experimental foi realizado, e também pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo nº 161/05) (Anexo A).

3.6. Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) foi utilizado para avaliar se as variáveis contínuas apresentavam distribuição normal. A análise estatística das variáveis contínuas de distribuição normal foi realizada com ANOVA. O teste de Kruskal–Wallis foi empregado para avaliar variáveis contínuas de distribuição não-Gaussiana. Como foi necessária a comparação de múltiplas amostras, utilizaram-se os testes de *post-hoc* de Fisher e Tukey-Kramer para o ajuste (ou correção dos valores de P). Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Utilizou-se o programa StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC,EUA) para o processamento dos testes estatísticos.

4. RESULTADOS

4.1. Peso dos coelhos

Cinquenta coelhos do sexo feminino e raça Nova Zelândia foram incluídos no estudo, com peso variando de 1750g a 2270g. As médias de peso de cada grupo foram $1968,0 \pm 86,3$ g no grupo bimatoprosta, $2159,0 \pm 85,8$ g no grupo travoprosta, $2111,0 \pm 138,4$ g no grupo latanoprosta, $2107,0 \pm 70,8$ g no grupo timolol e $2026,0 \pm 125,3$ no grupo CBA. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos bimatoprosta e travoprosta ($p=0,002$), entre os grupos bimatoprosta e latanoprosta ($P=0,0037$), entre os grupos bimatoprosta e latanoprosta ($P=0,0047$) e também entre os grupos travoprosta e CBA ($P=0,0065$).

4.2. Comparação com olhos contra-laterais

4.2.1. Células Caliciformes:

A tabela I revela o número médio de células caliciformes medido em cada grupo oito dias após o início do tratamento.

Tabela I: Número médio de células caliciformes no epitélio conjuntival de coelhos após oito dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		P
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprosta	n = 5	8,80	2,70	11,00	3,68	0,145
Travoprosta	n = 5	5,40	2,37	10,40	2,95	0,001
Latanoprosta	n = 5	8,00	2,00	8,40	2,88	0,732
Timolol	n = 5	10,40	3,50	9,20	2,30	0,377

Observou-se aumento estatisticamente significativo no número de células caliciformes nos olhos tratados com travoprostá ($P=0,001$) oito dias após o início do tratamento (Figura 20).

Figura 20: Fotomicrografias (400x) de amostras conjuntivais do olho controle (A) e olho tratado (B) do grupo travoprostá. Coloração PAS. Observa-se aumento do número de células caliciformes em B.

A tabela II revela o número médio de células calciformes medido em cada grupo 30 dias após o início do tratamento.

Tabela II: Número médio de células calciformes no epitélio conjuntival de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		P
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprost	n = 5	7,50	1,65	10,30	1,82	0,002
Travoprost	n = 5	8,40	3,10	7,66	2,73	0,594
Latanoprost	n = 5	7,20	1,54	9,70	2,21	0,009
Timolol	n = 5	9,40	4,20	10,20	2,57	0,617
CBA	n = 5	8,43	3,31	6,71	2,55	0,204

Observou-se aumento estatisticamente significativo do número de células calciformes nos animais tratados com bimatoprost ($P=0,002$) e latanoprost ($P=0,009$) 30 dias após o início do tratamento. (Figuras 21 e 22)

Figura 21: Fotomicrografias (400x) de amostras conjuntivais do olho controle (A) e olho tratado (B) do grupo bimatoprostá após 30 dias de tratamento. Coloração PAS. Observa-se aumento do número de células caliciformes em B.

Figura 22: Fotomicrografias (400x) de amostras conjuntivais do olho controle (A) e do olho tratado (B) do grupo latanoprostá após 30 dias de tratamento. Coloração PAS. Observar aumento do número de células caliciformes em B.

4.2.2. Espessura Epitelial

A tabela III revela a espessura epitelial média da conjuntiva de coelhos mensurada em cada grupo oito dias após o início do tratamento.

Tabela III: Espessura epitelial média da conjuntiva de coelhos após oito dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		P
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprost	n = 5	15,23	3,84	11,29	4,37	0,151
Travoprost	n = 5	13,00	2,83	11,21	2,97	0,552
Latanoprost	n = 5	8,74	0,34	12,83	3,35	0,201
Timolol	n = 5	14,03	0,36	15,02	4,34	0,773

Após oito dias de tratamento, não houve variação estatisticamente significativa da espessura epitelial da conjuntiva de coelhos tratados.

A tabela IV revela a espessura epitelial média dos olhos tratados e olhos controle em cada grupo 30 dias após o início do tratamento.

Tabela IV: Espessura epitelial média da conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e cloreto de benzalcônio.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		<i>P</i>
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprost	n = 5	13,06	4,18	12,81	3,96	0,945
Travoprost	n = 5	15,42	3,77	13,49	4,24	0,588
Latanoprost	n = 5	10,70	2,51	14,12	4,00	0,371
Timolol	n = 5	10,88	0,40	14,19	0,68	0,004
CBA	n = 5	15,57	5,02	16,33	4,10	0,519

Observou-se aumento estatisticamente significativo da espessura epitelial conjuntival no grupo tratado com maleato de timolol ($P=0,004$) em relação ao olho contralateral. (Figura 23)

Figura 23: Fotomicrografia (400x) de amostras conjuntivais do olho controle (A) e do olho tratado (B) do grupo timolol após 30 dias de tratamento. Coloração HE. Observar aumento da espessura epitelial em (B).

4.2.3. Numero de Vasos

A tabela V revela o número de vasos na conjuntiva de coelhos mensurada em cada grupo oito dias após o início do tratamento.

Tabela V: Número médio de vasos na conjuntiva de coelhos após oito dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		P
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprost	n = 5	1,40	1,67	2,40	2,41	0,468
Travoprost	n = 5	1,20	1,79	1,60	0,55	0,645
Latanoprost	n = 5	1,50	0,58	1,60	1,34	0,894
Timolol	n = 5	1,60	1,52	2,80	1,48	0,242

Não se observou alteração estatisticamente significativa no número médio de vasos em nenhum dos grupos oito dias após o início do tratamento.

A tabela VI revela o número de vasos na conjuntiva de coelhos mensurada em cada grupo trinta dias após o início do tratamento.

Tabela VI: Número médio de vasos na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		<i>P</i>
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprost	n = 5	1,20	0,84	3,80	3,35	0,130
Travoprost	n = 5	0,80	1,30	1,80	1,30	0,260
Latanoprost	n = 5	1,00	1,00	4,80	2,78	0,021
Timolol	n = 5	1,20	0,84	3,80	0,84	0,001
CBA	n = 5	1,50	0,58	2,33	2,33	0,512

Observou-se após 30 dias de tratamento um aumento estatisticamente significativo do número médio de vasos na conjuntiva de coelhos tratados com maleato de timolol ($P=0,001$) e latanoprost ($P=0,021$). (Figura 24)

Figura 24: Fotomicrografias (400x) de amostras conjuntivais do olho controle (A) e do olho tratado do grupo timolol (B) após 30 dias de tratamento. Coloração HE. Nota-se o aumento do número de vasos em (B).

4.2.4. Diâmetro Vascular

A tabela VII revela a medida do diâmetro vascular médio na conjuntiva de coelhos mensurada em cada grupo oito dias após o início do tratamento.

Tabela VII: Medida do diâmetro vascular médio na conjuntiva de coelhos após oito dias de tratamento tópico com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		P
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprost	n = 5	15,05	8,14	17,29	7,17	0,658
Travoprost	n = 5	10,95	9,08	19,73	4,65	0,008
Latanoprost	n = 5	18,09	2,43	4,54	6,45	0,288
Timolol	n = 5	14,87	3,76	16,80	3,40	0,345

Observou-se aumento estatisticamente significativo do diâmetro vascular médio no grupo que recebeu travoprost ($P=0,008$) oito dias após o início do tratamento.

A tabela VIII revela a medida do diâmetro vascular médio na conjuntiva de coelhos mensurada em cada grupo 30 dias após o início do tratamento.

Tabela VIII: Diâmetro vascular médio na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento tópico com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio.

GRUPOS		OD (Olho Controle)		OE (Olho Tratado)		<i>P</i>
		MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	
Bimatoprost	n = 5	13,89	6,85	17,66	5,15	0,324
Travoprost	n = 5	23,97	8,15	13,72	2,61	0,035
Latanoprost	n = 5	13,88	1,92	19,15	9,01	0,275
Timolol	n = 5	23,74	6,96	22,62	5,90	0,747
CBA	n = 5	13,01	6,85	2,33	2,33	0,512

Após 30 dias de tratamento, observou-se redução estatisticamente significativa do diâmetro vascular no grupo tratado com travoprost ($P=0,035$).

4.2.5. Reação Inflamatória

A presença de reação inflamatória foi observada nos olhos submetidos a tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol quando comparados aos olhos controles e também aos olhos tratados com colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio.

No 8º e 30º dia após o início do tratamento, o padrão de reação inflamatória foi focal com predomínio de linfócitos e raros neutrófilos nos olhos não-tratados e nos olhos tratados com colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio. A intensidade da reação inflamatória foi considerada leve (+) (Figura 25).

Nos olhos submetidos a tratamento com maleato de timolol e análogos das prostaglandinas, além do padrão inflamatório focal já relatado, observou-se um padrão de reação inflamatória mais difuso, formado por uma população mista de neutrófilos e linfócitos, presente em intensidade moderada (++) nos grupos que utilizaram análogos de prostaglandinas e intensa (+++) no grupo tratado com maleato de timolol (Figura 26). Neste último grupo, observou-se também um aumento da densidade subepitelial de colágeno.

A tabela IX revela a intensidade do infiltrado inflamatório focal na conjuntiva de coelhos de cada grupo após oito e 30 dias do início do tratamento.

Tabela IX: Intensidade do infiltrado inflamatório focal conjuntival nos grupos tratados (OE) por bimatoprost, travoprost, latanoprost, maleato de timolol e cloreto de benzalcônio e seus controles (OD) aos oito e trinta dias.

GRUPOS	OD (Controle)		OE (Tratado)	
	8 DIAS	30 DIAS	8 DIAS	30 DIAS
Bimatoprost	+	+	-	-
Travoprost	+	+	-	-
Latanoprost	+	+	-	-
Timolol	+	+	-	-
CBA	+	+	+	+

A tabela X revela a intensidade do infiltrado inflamatório difuso na conjuntiva de coelhos de cada grupo após oito e 30 dias do início do tratamento.

Tabela X: Intensidade do infiltrado inflamatório difuso conjuntival nos grupos tratados (OE) por bimatoprost, travoprost, latanoprost, maleato de timolol e cloreto de benzalcônio e seus controles (OD) aos oito e 30 dias.

GRUPOS	OD (Controle)		OE (Tratado)	
	8 DIAS	30 DIAS	8 DIAS	30 DIAS
Bimatoprost	-	-	++	++
Travoprost	-	-	++	++
Latanoprost	-	-	++	++
Timolol	-	-	+++	+++
CBA	-	-	-	-

Figura 25: Fotomicrografia (400x) de amostras conjuntivais de olho controle (A) e olho tratado (B) após 30 dias de tratamento com CBA. Coloração HE. Notar presença de infiltrado inflamatório focal leve em (B).

Figura 26: Fotomicrografias (400x) de amostras conjuntivais de olho controle (A) e olho tratado (B) após 30 dias de tratamento com maleato de timolol. Coloração HE. Notar presença de infiltrado inflamatório intenso (seta preta), congestão vascular e de fibrose subepitelial (seta azul) em (B).

4.3. Comparação entre as medicações

A tabela XI revela a comparação dos olhos tratados (olhos esquerdos) 30 dias após o início do tratamento, com finalidade de identificar diferenças entre os tratamentos aplicados (bimatoprost, latanoprost, travoprost, maleato de timolol e lubrificante contendo cloreto de benzalcônio), avaliando-se quatro parâmetros: número de células caliciformes, diâmetro vascular, número de vasos e espessura epitelial.

Tabela XI: Comparação entre as médias dos olhos tratados com análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e lubrificante com conservante.

OLHOS ESQUERDOS	
GRUPOS 1-5	<i>P</i>
Células Caliciformes	0,021
Diâmetro Vascular	0,295
Número de Vasos	0,088
Espessura Epitelial	0,287

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados apenas no número de células caliciformes ($p=0,021$). Comparando-se as médias dos grupos, verificou-se que os grupos tratados com bimatoprost e maleato de timolol diferiam do grupo tratado com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio ($p<0,05$).

5. DISCUSSÃO

Fortes evidências baseadas em estudos clínicos e experimentais demonstraram que o uso prolongado de medicações antiglaucomatosas induzem diversas alterações da superfície ocular.

O uso de colírios antiglaucomatosos está relacionado à presença de inflamação e fibrose subconjuntival, apoptose do epitélio conjuntival e também alteração da superfície corneana. (Broadway et al., 1994; Arici et al., 2000; Mietz et al., 2001; Baudouin et al., 2004). A presença de inflamação subclínica é comprovada pela presença de células inflamatórias no epitélio e substância própria conjuntival em inúmeros estudos. (Sherwood et al., 1989; Baudouin et al., 1994; Broadway et al., 1994; Cvenkel e Ihan, 2002; Bensoussan et al., 2003; Baudouin et al., 2004).

Grande parte dos estudos realizados sobre superfície ocular e glaucoma foi desenvolvida antes do advento das prostaglandinas, e nenhum compara os três análogos das prostaglandinas como o nosso estudo. A maioria dos artigos publicados compara tratamentos com drogas hoje em desuso, como epinefrina e pilocarpina (Brandt et al., 1991; Herreras et al., 1992; Broadway et al., 1994; Nuzzi et al., 1995) e somente alguns incluem a latanoprost (Bensoussan et al., 2003; Cvenkel e Ihan, 2002).

Herreras et al (1992) avaliaram a superfície ocular de três grupos de pacientes: sujeitos normais (grupo 1), pacientes com glaucoma antes de iniciarem tratamento com beta-bloqueador (grupo 2) e usuários de beta-bloqueador por período superior a seis meses (grupo 3). O grupo 2 foi reavaliado três meses após o início do tratamento. Os testes diagnósticos utilizados foram: teste de Schirmer, altura do menisco lacrimal, tempo de

ruptura do filme lacrimal, coloração por corantes vitais Rosa Bengala e fluoresceína, teste de cristalização da lágrima, coloração do muco e citologia de impressão da conjuntiva bulbar superior. O grupo controle apresentou valores normais em todos os testes, enquanto o grupo usuário crônico de timolol apresentou alteração estatisticamente significativa ($p < 0,001$) dos testes de Schirmer, tempo de ruptura do filme lacrimal e coloração por fluoresceína e rosa bengala. A citologia de impressão demonstrou redução da densidade de células caliciformes ($p < 0,001$) e redução do padrão arboriforme do teste de cristalização da lágrima, sinais sugestivos de ceratoconjuntivite sicca. O grupo dois, que iniciou tratamento com timolol, apresentou já no terceiro mês alterações dos testes de Schirmer ($p < 0,01$) e tempo de ruptura do filme lacrimal ($p < 0,001$) comparado ao controle inicial, e a citologia de impressão demonstrou redução progressiva da densidade das células caliciformes, confirmando que o tratamento antiglaucomatoso tópico com beta-bloqueador induz alterações da superfície ocular causando sinais e sintomas de olho seco.

Brandt e colaboradores (1991) realizaram estudo que incluiu 72 pacientes com glaucoma usuários de epinefrina ou dipivefrina, beta-bloqueadores e mióticos por períodos superiores a três meses, isoladamente ou em associação, submetidos à citologia de impressão da conjuntiva bulbar e palpebral. Utilizaram como grupo controle pacientes suspeitos de glaucoma, que não faziam uso de medicação. As amostras foram graduadas por examinador mascarado e classificadas conforme o grau de metaplasia, de zero (normal) a três (metaplasia severa e difusa). Observou-se correlação

direta entre o grau de metaplasia e o número de medicações utilizadas ($p=0,175$), ou seja, quanto maior o número de medicações utilizadas, maior o grau de metaplasia do epitélio conjuntival.

Baudouin (2004) também realizou estudo caso-controle em 69 pacientes com glaucoma tratados cronicamente (período superior a um ano) com a finalidade de comparar a expressão de células conjuntivais e citocinas inflamatórias a um grupo controle formado por 15 pacientes não tratados com medicações tópicas. Dos pacientes glaucomatosos, 27 foram tratados com beta-bloqueador contendo conservante, 24 receberam instilação de beta-bloqueador livre de conservante, e os 18 restantes foram tratados por associação de pelo menos duas drogas contendo conservante. Citologia de impressão, imunohistoquímica e citometria de fluxo foram as técnicas empregadas para avaliação dos parâmetros: expressão de HLA-DR, IL-6, IL-8 e IL-10. Observou-se aumento de todos os marcadores inflamatórios e seus mediadores nos pacientes com glaucoma quando comparados ao grupo controle, sendo que a expressão de HLA-DR foi significativamente maior nos grupos que receberam medicação contendo conservante. Todas as interleucinas tiveram expressão equivalente nos grupos tratados, exceto a IL-8, que foi significativamente maior no grupo submetido a tratamento múltiplo em comparação ao grupo tratado com beta-bloqueador sem conservante. O estudo comprovou que os pacientes com glaucoma quando submetidos a tratamento prolongado apresentam maior expressão de marcadores inflamatórios.

5.1) Os análogos de prostaglandinas e reação inflamatória

O fato dos análogos de prostaglandinas fazerem parte do grupo dos eicosanóides, substâncias derivadas do ácido aracdônico, componentes da cascata inflamatória, nos fez supor que as alterações conjuntivais inflamatórias induzidas por essas medicações seriam mais pronunciadas. Os sinais e sintomas observados quando da instilação desses compostos em nossos pacientes, incluindo hiperemia conjuntival, congestão ocular, desconforto, prurido eventual, mesmo que temporários, também davam suporte à nossa hipótese inicial.

A dúvida sobre a indução de reação inflamatória pelos medicamentos antiglaucomatosos, especialmente os análogos de prostaglandinas, não é recente, como descreveremos a seguir.

Durante estudos para o desenvolvimento da bimatoprosta, Woodward e colaboradores (1990), observaram que a prostaglandina D2 era um potente hipotensor ocular, porém, induzia reação inflamatória conjuntival. Observou-se aumento da permeabilidade microvascular, infiltração por eosinófilos e diminuição de células caliciformes, alterações que se mostraram dose-dependentes. Avaliou-se também a substância BW245C, um agonista seletivo para o receptor PGD2 e seus metabólitos, que não causou efeitos inflamatórios na conjuntiva.

Em estudo realizado por Cellini e colaboradores (2004), cuja finalidade era observar reação inflamatória de câmara anterior em 60 usuários de latanoprosta 0,005%, travoprosta 0,004% e bimatoprosta 0,03%,

com período de observação de seis meses, observou-se que a quebra de barreira hemato-aquosa induzida por travoprostá ($p < 0.013$) e por bimatoprostá (< 0.001) era significativamente menor do que a induzida por latanoprostá.

Arcieri e colaboradores (2005), em estudo envolvendo análogos das prostaglandinas (latanoprostá, bimatoprostá, travoprostá e unoprostona isopropílica), cujo objetivo era avaliar alterações da barreira hemato-aquosa induzida pelas mesmas em olhos afácicos e pseudofácicos, observaram um aumento significativo do “flare” nos usuários dessas medicações ($p < 0,02$). Além disso, detectaram a instalação de edema macular cistóide em seis dos 48 olhos estudados, que regrediu com a retirada da medicação e tratamento com colírios antiinflamatórios não-hormonais.

Por outro lado, Guglielminetti et al (2002) publicaram estudo que avaliava a expressão de marcador inflamatório (HLA-DR) na superfície ocular em amostras coletadas por raspado conjuntival e citologia de impressão utilizando imunohistoquímica. Esse estudo incluiu 14 pacientes tratados com latanoprostá 0,05% durante um período de quatro meses, comparados a outro grupo tratado apenas com lubrificantes contendo cloreto de benzalcônio na mesma concentração da droga estudada (0,02%). Como resultado, observaram maior expressão de HLA-DR no grupo tratado com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio ($p < 0,001$), o que sugere que a latanoprostá possa, na realidade, reduzir a resposta inflamatória conjuntival induzida pelo conservante.

Em estudo semelhante que reforça essa informação, Bensoussan e colaboradores (2003) investigaram a expressão de três marcadores inflamatórios (HLA-DR, IL-6 e IL-8) utilizando imunohistoquímica aplicada em amostras de células conjuntivais epiteliais coletadas por citologia de impressão. A amostra foi composta por 60 pacientes, sendo 45 tratados com medicação antiglaucomatosa (beta-bloqueadores, prostaglandinas, inibidores da anidrase carbônica, com ou sem conservantes) durante o período de um ano e o grupo controle composto por 15 pacientes não submetidos a tratamento. Observou-se expressão aumentada de HLA-DR, IL-6 e IL-8 principalmente nas amostras de pacientes submetidos a tratamento com múltiplas drogas ou que utilizavam drogas com maior concentração de conservante (cloreto de benzalcônio). Detectou-se menor expressão nas amostras de usuários de latanoprost. Não foi detectada expressão dos marcadores inflamatórios nas amostras tratadas com beta-bloqueadores sem conservante.

Contrariando a hipótese de que os análogos de prostaglandinas produziram maior reação inflamatória, os coelhos que utilizaram análogos de prostaglandinas apresentaram menor reação inflamatória quando comparados ao grupo que utilizou timolol por um período curto (30 dias).

No presente estudo, observou-se a presença de reação inflamatória de padrão crônico (após cinco dias de inflamação) e difuso com padrão misto de neutrófilos e linfócitos em todos os grupos submetidos a tratamento tópico antiglaucomatoso, possivelmente decorrente da droga propriamente dita, uma vez que estas alterações não foram evidentes nos grupos controle

e no grupo CBA. O grupo tratado com maleato de timolol apresentou reação mais intensa que os demais, mesmo utilizando-se uma dose inferior ao recomendado para o tratamento do glaucoma (uma gota ao dia) e por período considerado curto (30 dias). No grupo controle e no grupo que recebeu instilação de lubrificante com cloreto de benzalcônio, observou-se a presença de infiltrado inflamatório do tipo focal com predomínio de linfócitos com raros neutrófilos.

A presença desse infiltrado focal nos olhos contra-laterais (controles) poderia ter relação com a ação sistêmica das drogas utilizadas. É possível que esse infiltrado seja uma característica da espécie ou ainda decorrente do convívio no biotério não ser em jaulas individuais.

Sabe-se que a presença de inflamação na conjuntiva resulta em potencial risco de falência de uma cirurgia fistulizante antiglaucomatosa posterior, devido à fibrose pós-operatória (Addicks et al.,1983; Sherwood et al.,1989; Young et al.,1990; Brandt et al.,1991; Broadway et al.,1994 e 1996; Ihan e Cvenkel, 2000).

Young e colaboradores (1990) realizaram estudo experimental em 20 coelhos tratados por quatro meses com timolol 0,5%, pilocarpina 4% e epinefrina 1%, na posologia de duas gotas ao dia, além de um grupo que recebeu colírio lubrificante. Após esse período, metade dos animais foram submetidos a esclerectomia posterior, enquanto a outra metade serviu como controle não-cirúrgico. Os animais foram sacrificados cinco dias após a cirurgia e o sítio cirúrgico foi analisado por microscopia e imunohistoquímica. Todos os grupos tratados com medicação antiglaucomatosa apresentaram

aumento de miofibroblastos, especialmente o grupo tratado com pilocarpina. No grupo tratado não-cirúrgico também foi detectada a presença de miofibroblastos na conjuntiva, justificando maior tendência à falência de trabeculectomia em pacientes sob tratamento prévio.

Broadway et al. (1994), conforme estudo citado anteriormente que incluiu 124 pacientes usuários crônicos de medicação antiglaucomatosa submetidos à biópsia no momento da cirurgia filtrante, descreveu dentre os achados histopatológicos per-operatórios a presença de macrófagos e linfócitos no epitélio conjuntival e aumento dos fibroblastos, macrófagos, linfócitos e mastócitos na substância própria da conjuntiva, tanto superficial quanto profunda. Observaram que esses pacientes que possuíam reação inflamatória conjuntival subclínica no pré-operatório apresentaram maior taxa de falência da cirurgia filtrante (55% após 3 anos de tratamento versus 86% em pacientes que se trataram por menos de 2 meses), e que a reação era tão exacerbada quanto maior o número de drogas e quanto maior o tempo de utilização.

Em estudo posterior, Broadway e colaboradores (1996) submeteram 30 pacientes candidatos a trabeculectomia, usuários de terapia antiglaucomatosa máxima, à biópsia conjuntival bulbar inferior e a tratamento prévio com corticosteróide tópico (fluormetolona 1% na posologia de 4 vezes ao dia) com finalidade de reverter os efeitos inflamatórios induzidos pelas medicações antiglaucomatosas. Como resultado, observou redução do número de fibroblastos e células inflamatórias na conjuntiva, o que poderia influenciar positivamente o sucesso cirúrgico.

Ihan e Cvenkel (2000) observaram em dez pacientes usuários de terapia antiglaucomatosa por período mínimo de um ano e submetidos à trabeculectomia que há aumento da expressão de HLA-DR e linfócitos T no epitélio conjuntival no per-operatório e que esses índices mantêm-se por até seis meses subseqüentes à cirurgia, indicando a possibilidade das células conjuntivais induzirem resposta imune e posterior fibrose ou falência da cirurgia filtrante.

Outros autores como Brandt et al. (1991) e Sherwood et al. (1989) também descreveram alterações morfológicas conjuntivais e tenonianas em pacientes submetidos a trabeculectomia após uso crônico de medicações. Sherwood e colaboradores (1989) realizaram biópsias conjuntivais e da cápsula de Tenon no momento da realização da cirurgia filtrante, dividindo-as em dois grupos: provenientes de pacientes tratados previamente e de pacientes usuários de no mínimo duas medicações tópicas por período mínimo de um ano. Observou-se aumento significativo do número de macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos na conjuntiva e na cápsula de Tenon no grupo submetido a tratamento prolongado, além de redução do número de células caliciformes.

Lavin et al. (1990) obteve melhores resultados da cirurgia fistulizante antiglaucomatosa em pacientes que usaram medicação antiglaucomatosa por curto período (menos que duas semanas) ou ainda virgens de tratamento.

Mietz et al. (2003) utilizaram fibroblastos humanos cultivados, tratados e não tratados com latanoprost e realizaram estudo experimental em 12

coelhos tratados com a mesma droga por um período que variou de uma semana a 30 dias. A finalidade do estudo era detectar a presença de metaloproteinases (MMP) e inibidores teciduais (TIMP) nos fibroblastos da cápsula de Tenon, essenciais para o controle da remodelação e reparo celular, o que influencia diretamente a viabilidade da bolha filtrante formada após a trabeculectomia. Os autores observaram aumento dos níveis de MMP-3 e TIMP-2 após o tratamento com latanoprost, quando comparado aos animais normais, o que poderia influenciar positivamente o resultado futuro de uma cirurgia filtrante. O verdadeiro papel das metaloproteinases e seus inibidores ainda são desconhecidos, porém estima-se que a atividade dessas moléculas possa reduzir a fibrose e alterações teciduais (como acúmulo de material amorfo) após a cirurgia filtrante.

Estudos comparativos realizados com maleato de timolol e latanoprost em material obtido por citologia de impressão em pacientes glaucomatosos mostraram diferenças entre as drogas. Cvenkel e Ihan (2002) avaliaram 40 pacientes com diagnóstico de glaucoma ou hipertensão ocular, utilizando as seguintes medicações: latanoprost (n=14), betaxolol (n=12) e timolol (n=14) durante período mínimo de três meses, comparando-os a um grupo controle (n=12) sem medicação. O propósito do estudo era detectar a expressão de HLA-DR e linfócitos T nos usuários de monoterapia, coletando-se amostras por citologia de impressão e utilizando-se citometria de fluxo. Houve um aumento da expressão de HLA-DR pelas células conjuntivais epiteliais em todos os grupos (latanoprost $p<0,05$, betaxolol $p<0,01$ e timolol $p<0,01$), indicando que a inflamação subclínica induzida

pelo tratamento monoterápico ocorre independentemente da droga, posologia e tempo de instilação. Latanoprostá apresentou expressão menor de HLA-DR, e por conseguinte, menor reação inflamatória, compatível com os achados do nosso estudo.

5.2) Alterações vasculares

No presente estudo, não houve aumento do número de vasos em todos os grupos, apenas nos grupos tratados por latanoprostá e maleato de timolol após 30 dias de tratamento. Pode-se supor que a hiperemia conjuntival induzida pelos análogos de prostaglandinas e mesmo por timolol cronicamente deva-se à neovascularização, já que não houve alterações nos olhos controles. Além disso, em todos os grupos, especialmente no grupo que utilizou timolol, observou-se presença de infiltrado inflamatório, e a inflamação sabidamente induz formação de neovasos. Interessante notar que as drogas associadas à maior incidência de hiperemia conjuntival (bimatoprostá e travoprostá) não apresentaram aumento do número de vasos em nosso estudo (Kook, 2000; Sherwood et al., 2001; Brandt et al., 2001; Bernstein et al., 2003; Feldman et al., 2003; Arcieri et al., 2003). O grupo tratado com travoprostá apresentou apenas redução do diâmetro vascular ao final do período de observação (30 dias).

Não há técnica específica para detectar neovascularização, e sim a presença ou não de vasos de menor área ou calibre e em maior número.

O fato de não termos realizado eutanásia dos animais acompanhada de enucleação e sim sedação seguida de biópsia, apesar de todos os

procedimentos terem sido realizados pelo mesmo cirurgião (HR), pode justificar um possível erro de local de coleta. Desta forma, pode-se ter biopsiado conjuntiva em regiões diferentes do limbo e, por conseguinte, observarmos alterações da arquitetura celular. Esse fato não ocorreria caso fossem realizados os cortes anatômicos sobre os globos oculares enucleados, o que preservaria a conjuntiva e demais estruturas anatômicas, escolhendo-se áreas pré-determinadas para coleta do material em todos os animais.

Deve-se ressaltar que os nossos resultados remontam da observação por um curto período (trinta dias), muito pequeno quando comparado ao tratamento crônico do glaucoma. Finalmente, deve-se frisar que o estudo em questão foi realizado em coelhos, que parecem ser animais mais suscetíveis à toxicidade das drogas e preservativos do que os humanos (Brandt et al, 1991).

5.3) Alterações de células caliciformes

No presente estudo, observou-se ao oitavo dia um aumento do número de células caliciformes no grupo tratado com travoprostá, o que não se manteve até o trigésimo dia. Os animais tratados com bimatoprostá e latanoprostá também apresentaram esse aumento de células caliciformes, porém mais tardiamente, no trigésimo dia.

Estudos como o de Moreno e colaboradores (2003) demonstraram aumento de células caliciformes em 20 pacientes após 30 dias de tratamento com latanoprostá. As amostras foram avaliadas utilizando citologia de

impressão durante seis meses. Esse efeito, porém, não permaneceu no grupo analisado ao longo do período de observação.

Outros autores como Aragona et al. (1987) e Dabbagh et al. (2003) relacionaram o aumento do número e de secreção de células caliciformes ao estímulo por componentes inflamatórios. Os primeiros, em estudo experimental, relataram um aumento da produção de mucina na conjuntiva de coelhos após administração de análogo de prostaglandina E2 durante período de três semanas.

Dabbagh et al. (2003), em estudo realizado *in vitro*, com a utilização de mediadores inflamatórios, em específico IL-4, conseguiram diferenciar células epiteliais brônquicas em células caliciformes, o que sugere que é possível induzir a formação de tipo celular produtor de muco decorrente do processo inflamatório. Ou seja, é possível que a reação inflamatória isoladamente, e não as drogas em si, sejam a causa do aumento de células caliciformes, por diferenciação celular das células epiteliais conjuntivais. No entanto, se esse fosse o caso, no nosso estudo teríamos observado um maior número de células caliciformes no grupo tratado com timolol, que exibiu maior intensidade de reação inflamatória.

Esses achados foram semelhantes aos resultados de nosso trabalho e sua significância é desconhecida. Sugere-se que esse fato possa estar relacionado à presença de menores sintomas de olho seco em usuários de análogos de prostaglandinas quando comparados a maleato de timolol.

De fato, vários estudos na literatura demonstraram redução do tempo de ruptura do filme lacrimal e do número de células caliciformes com beta-bloqueadores (Herrerias et al., 1992; Baudouin et al., 1996; Broadway et al., 1996; Thygesen et al., 2000).

Thygesen e colaboradores (2000), realizando estudo com 37 pacientes utilizando latanoprost e maleato de timolol por curto espaço de tempo (27 dias), investigaram efeitos sobre o filme lacrimal e superfície ocular após utilização das drogas. Houve redução do tempo de ruptura do filme lacrimal (break-up time) principalmente no grupo tratado com timolol, porém os valores se encontraram ainda dentro dos níveis normais, além de aumento da área corada por Rosa Bengala na córnea e conjuntiva de ambos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa.

Pisella e colaboradores (2000) realizaram estudo experimental com 36 coelhos albinos divididos aleatoriamente em seis grupos, que foram tratados por 60 dias com maleato de timolol nas concentrações 0,25% e 0,50% contendo conservante cloreto de benzalcônio 0,01%, timolol nas mesmas concentrações porém contendo outro conservante (brometo de benzodecinio 0,012%) e maleato de timolol 0,25% e 0,50% livre de conservantes. Durante o período de estudo, os animais foram avaliados na lâmpada de fenda e submetidos ao teste de ruptura do filme lacrimal, sendo enucleados ao final de 60 dias. Não houve diferença na avaliação biomicroscópica entre os grupos, com exceção do tempo de ruptura do filme lacrimal, que foi reduzido nos grupos que continham maior concentração da droga e conservantes. A análise histológica também confirmou esses

achados, demonstrando maiores alterações epiteliais conjuntivais e no estroma corneano nos animais tratados com colírios que continham conservantes.

Arici et al. (2000) também realizaram estudo que avaliava as alterações da superfície ocular induzida por tratamento antiglaucomatoso prolongado, realizando teste de Schirmer, tempo de ruptura do filme lacrimal e citologia de impressão. Os pacientes foram divididos em três grupos: um grupo controle (n=30), um grupo tratado com betaxolol 0,5% (n=24), um grupo tratado com maleato de timolol 0,5% (n=27) e um quarto grupo tratado com associação medicamentosa de timolol 0,5% e dipivefrina 1% (n=26). Todos os grupos submetidos a tratamento apresentaram redução significativa dos testes de Schirmer e do tempo de ruptura do filme lacrimal ($p<0,01$) quando comparados ao grupo controle. Os escores da citologia de impressão foram igualmente reduzidos ($p<0,01$) nos grupos tratados com os antiglaucomatosos, confirmando presença reduzida de células caliciformes, quando comparados ao controle.

Steuhl et al (1991) estudaram os efeitos dos colírios antiglaucomatosos na diferenciação das células do epitélio conjuntival comparando a 48 indivíduos normais. Os pacientes tratados receberam instilação de pilocarpina (1%), timolol (0,5%) ou levobunolol (0,5%) (n=36) por período mínimo de um ano. Os pacientes tratados com beta-bloqueadores apresentaram redução das células caliciformes da conjuntiva bulbar, além de perda de desmossomos e *zônula ocludens* na superfície celular após um ano de tratamento.

Ao contrário dos estudos citados anteriormente, nossos achados não incluíram a redução do número de células caliciformes após uso de maleato de timolol. Possivelmente, isso ocorreu devido ao curto espaço de tempo a que os coelhos ficaram expostos à medicação.

5.4) Alterações epiteliais e subepiteliais

Com relação à espessura epitelial, o presente estudo não detectou alterações nos grupos tratados com análogos de prostaglandinas ou cloreto de benzalcônio (CBA). Observamos um aumento da espessura epitelial somente no grupo tratado com maleato de timolol após 30 dias de tratamento, achado previamente descrito por outros autores (Sherwood et al., 1989; Brandt et al., 1991; Noecker et al., 2003).

O aumento da espessura epitelial observado nesse estudo pode ser secundário a edema celular epitelial ou à presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos, mastócitos), abundante na conjuntiva tratada com maleato de timolol. O aumento da espessura epitelial pode explicar a ocorrência de sintomas de olho seco, comuns após tratamento com beta-bloqueadores (Herreras et al., 1992).

Nossos resultados estão de acordo com estudos que reportam que análogos de prostaglandinas induzem menores alterações morfológicas na substância própria da conjuntiva do que o maleato de timolol preservado. Observamos menor densidade de fibras colágenas nestes grupos do que no grupo tratado com maleato de timolol, confirmando os resultados de Mietz et al. (1994, 2001). Além disso, identificamos fibrose sub-epitelial no grupo

tratado com maleato de timolol, achado também descrito por outros autores. (Moreno et al., 2003; Baudouin et al., 1999).

Mietz et al. (1994) observaram um aumento subepitelial de colágeno, bem como aumento da expressão de anticorpos anti-colágeno tipo IV na conjuntiva de coelhos submetidos a tratamento com metipranolol 0,3% e pilocarpina 2%, com e sem conservante (cloreto de benzalcônio 0,01%), apenas nos grupos tratados com a medicação contendo conservante e não nos animais tratados somente com medicação.

Mietz e colaboradores (2001), em estudo posterior, realizaram experimento em coelhos, com duração de 18 meses, período em que os animais ficaram sob tratamento utilizando maleato de timolol, latanoprostá ou ambos. As amostras conjuntivais foram examinadas por microscopia convencional e eletrônica, além de imunohistoquímica para detecção de anticorpos contra metaloproteinases (MMP-3) e seu inibidor tecidual (TIMP-2). À microscopia eletrônica, os autores observaram que a área subepitelial de colágeno era significativamente maior ($p < 0,03$) no grupo tratado com timolol (71,6%) comparando-o aos controles (62,7%) e ao grupo tratado com latanoprostá (57,7%). Um aumento no acúmulo de material amorfo também foi observado nesse grupo (25,6% grupo timolol versus 7,6% dos controles), bem como redução de espaços vazios (2,5% dos usuários de timolol versus 39,4% dos controles) não encontrados no grupo latanoprostá. Alterações morfológicas como degeneração de fibrócitos foram vistas apenas no grupo timolol. O grupo latanoprostá apresentou aumento

da expressão de MMP-3, cuja atividade exacerbada resulta em redução do acúmulo de matriz extra-celular nesses olhos.

Nuzzi et al. (1995) realizaram estudo que identificou alterações morfológicas e imunohistoquímicas do epitélio conjuntival e na região subconjuntival induzidas pelo tratamento tópico para glaucoma a curto e longo prazo em pacientes submetidos a tratamento com timolol e pilocarpina. Observaram-se aumentos significativos da espessura e do número de camadas do epitélio conjuntival, aumento da densidade fibroblástica subepitelial e em tecido conjuntivo profundo, além de aumento da camada colágena subepitelial nos pacientes submetidos a tratamento por médio e longo prazo, conforme observamos em nosso estudo.

Por outro lado, Lark et al. (1999) estudaram os efeitos de latanoprostá e brimonidina nos fibroblastos conjuntivais de coelhos. O estudo incluiu doze coelhos divididos em três grupos: animais tratados com latanoprostá 0,005%, brimonidina 0,2% e solução salina balanceada (BSS), administrados em ambos os olhos, duas vezes ao dia, seis dias por semana, durante dez semanas. Após esse período, os olhos foram enucleados, processados e avaliados por microscopia óptica e imunohistoquímica, utilizando-se antígeno anti-proliferativo nuclear celular (PCNA). À microscopia óptica, observaram-se poucas células inflamatórias no espaço subconjuntival em todos os grupos. Houve aumento estatisticamente significativo no número de fibroblastos marcados pelo PCNA no grupo que recebeu brimonidina comparado ao grupo tratado com BSS. O grupo tratado com latanoprostá também apresentou aumento estatisticamente significativo

do número médio de fibroblastos comparado ao grupo tratado por brimonidina ou BSS.

Estudos como o de Moreno e colaboradores (2003), já citado anteriormente, não demonstraram aumento da espessura epitelial em 20 pacientes após seis meses de tratamento com latanoprost, utilizando a citologia de impressão para avaliação das amostras.

Baudouin et al. (1999) realizaram estudo de amostras conjuntivais de 61 pacientes no momento da trabeculectomia. Dos 61 pacientes, 30 vinham sendo tratados com monoterapia com beta-bloqueador, 26 com associação medicamentosa incluindo timolol por período mínimo de um ano, e cinco tiveram indicação de trabeculectomia antes de iniciar tratamento medicamentoso. Quanto à avaliação histo-patológica dos pacientes, 24 dos 26 submetidos a multi-tratamento apresentaram infiltração por células inflamatórias e aumento do número de fibroblastos. Dos tratados com monoterapia, 19 dos 30 apresentaram alterações semelhantes, enquanto apenas um dos cinco sem tratamento mostraram o mesmo padrão.

5.5) O papel dos conservantes

O conservante mais utilizado nas medicações é o cloreto de benzalcônio, e efeitos tóxicos relacionados a ele tem sido descritos em estudos clínicos, laboratoriais e experimentais (Takahashi et al., 1983; Herreras et al., 1992; Baudouin et al., 1994; Broadway et al., 1994; Mietz et al., 1994; Turacli et al., 1997; Nuzzi et al., 1998; Baudouin et al., 1999; De Saint Jean et al., 1999; Pisella et al., 2000; Costagliola et al., 2001; Blondin

et al., 2003; Baudouin et al., 2004; Pisella et al., 2004; Noeckers et al., 2004). Por ser uma amônia quaternária, esse composto é mais que um excipiente, e demonstrou-se que causa isoladamente instabilidade do filme lacrimal, diminuição de células caliciformes, metaplasia epitelial e apoptose, além de quebra de barreira epitelial (Herreras et al., 1992; Broadway et al., 1994; De Saint Jean et al., 1999).

Takahashi (1983), ao descrever um novo método para avaliar citotoxicidade celular, identificou efeitos deletérios induzidos pelo cloreto de benzalcônio. Utilizando cultura de células conjuntivais epiteliais humanas desenvolvidas pelo método de Chang, avaliou o tempo de exposição à droga (beta-bloqueadores em diferentes concentrações) necessário para promover 50% de dano celular (CDT50). Observou que o maleato de timolol sem conservante, tanto nas concentrações de 0,25% e 0,5%, não causou citotoxicidade em 64 minutos de exposição. Já as preparações disponíveis comercialmente, contendo benzalcônio como conservante, induziram citotoxicidade (CDT50) em 48,1 segundos (timolol 0,5%) e 2 minutos e 4 segundos (timolol 0,25%).

Baudouin e colaboradores (1994) investigaram antígenos conjuntivais inflamatórios utilizando citologia de impressão e imunohistoquímica em 107 olhos de 55 pacientes com glaucoma, 48 dos quais submetidos a tratamento medicamentoso por período superior a seis meses. O grupo controle foi formado por 15 pacientes normais (30 olhos) e 11 pacientes (22 olhos) usuários de colírio com pressuposta ação preventiva contra catarata contendo como conservante clorexidine. Os resultados mostraram ausência

de atividade inflamatória no grupo sem tratamento e expressão de HLA-DR pelas células conjuntivais em metade dos olhos tratados (43 dos 88 olhos), porém esses resultados não se relacionaram a um tratamento específico ou associação medicamentosa. Entretanto, o grupo que usou colírio com clorexidine teve menor atividade inflamatória que os que continham CBA, sugerindo toxicidade induzida pelo conservante CBA.

Turacli e colaboradores (1997) avaliaram 216 olhos de pacientes com glaucoma que utilizavam-se de timolol, levobunolol, betaxolol, pilocarpina, dipivefrina e associação medicamentosa, empregando citologia de impressão para detectar alterações de superfície conjuntival. Observaram que após três meses de tratamento, o grau de metaplasia é máximo e relaciona-se com o conservante.

Nuzzi et al. (1998) avaliaram pacientes usuários de medicação antiglaucomatosa cronicamente comparando-os a pacientes que utilizaram apenas o conservante cloreto de benzalcônio por citologia de impressão e avaliação de teste de Schirmer I, teste de ruptura do filme lacrimal e teste de Jones. Os autores demonstraram que tanto o filme lacrimal quanto a superfície ocular conjuntival mostram-se alterados em usuários crônicos de medicação ocular, e que essas modificações se relacionaram com tempo de instilação e principalmente à concentração de conservante utilizado.

Baudouin et al.(1999) realizaram outro estudo experimental, incluindo 25 ratos submetidos a tratamento com maleato de timolol 0,5% com e sem conservante e ainda um grupo foi tratado apenas com CBA durante 30 dias. Os autores concluíram que o conservante foi, em grande parte, responsável

pelos efeitos tóxicos e inflamatórios induzidos pelos colírios anti-glaucomatosos.

De Saint Jean e colaboradores (1999) compararam a toxicidade a curto prazo de timolol contendo ou não CBA em uma linhagem de células conjuntivais preservadas (Células conjuntivais de Chang). As células foram expostas por 15 minutos a timolol em várias concentrações (0.1%, 0.25% e 0.4%) com ou sem CBA. Os resultados mostraram que timolol associado à CBA induziu redução da viabilidade celular inicial de 40%, atingindo até 85% na avaliação após 24 horas. As células tratadas sem CBA apresentaram uma redução inicial da viabilidade celular, relacionado à concentração, e se recuperaram 24 horas depois. Apenas timolol com conservante induziu redução do tamanho celular. Os autores concluíram que timolol com CBA foi responsável por alterações irreversíveis na linhagem celular, porém os efeitos tóxicos de timolol isolado *in vitro*, mesmo não sendo predominantes, podem explicar os efeitos na superfície ocular de pacientes tratados por longo prazo.

Costagliola e colaboradores (2001) avaliaram a ocorrência de alergia ocular em 50 usuários de latanoprost e timolol e atribuíram esse fato à alta concentração de CBA e à instilação noturna do composto, aumentando a toxicidade.

Blondin e colaboradores (2003) avaliaram a participação do sistema complemento (mediador inicial da resposta inflamatória) na gênese dos infiltrados inflamatórios presentes no trabeculado e conjuntiva dos pacientes tratados com anti-glaucomatosos. Utilizaram plasma humano exposto a

medicamentos contendo CBA como conservante (timolol, betaxolol, carteolol e latanoprost) e drogas livres de conservantes com objetivo de avaliar atividade do complexo CH50. Os autores demonstraram que apenas o CBA e não as drogas anti-glaucomatosas isoladas ativaram o sistema complemento.

Estudo prospectivo realizado por Baudouin e colaboradores (2004), incluiu 69 pacientes seguidos durante 12 meses. Destes, 27 utilizavam beta bloqueador contendo conservativo, 24 utilizavam timolol 0,5% livre de conservante e 18 instilavam associação de drogas contendo conservantes, dos quais 11 utilizavam derivados de prostaglandinas e maleato de timolol. Para avaliação das alterações de superfície ocular, empregaram citologia de impressão e imunohistoquímica para detectar expressão de HLA DR, padrão de células inflamatórias, e interleucinas IL-6, IL-8 e IL-10 obtidas com citometria de fluxo. Os autores observaram aumento significativo da expressão de todos os marcadores inflamatórios em todos os grupos tratados, seja com beta-bloqueador isolado ou em associação, contendo ou não conservante, comparado aos olhos normais. O antígeno HLA DR foi detectado mais freqüentemente nos grupos com conservantes (46, 4% no grupo com preservativo e 63,4% no grupo que utilizou associações), enquanto IL-8 esteve mais presente no grupo tratado com associação medicamentosa. Os autores sugerem o desenvolvimento de conservantes não tóxicos ou soluções livres destes para que seja possível minimizar os efeitos locais induzidos pelos hipotensores oculares.

Pisella et al. (2000) compararam os efeitos das formulações de timolol contendo ou não conservante em coelhos albinos. Incluiu no estudo seis grupos de animais tratados por 60 dias com maleato de timolol nas concentrações 0,25% e 0,50% contendo cloreto de benzalcônio 0,01%, timolol nas mesmas concentrações porém contendo outro conservante (brometo de benzodecinio 0,012%) e maleato de timolol 0,25% e 0,50% livre de conservantes. O tempo de ruptura do filme lacrimal foi reduzido nos grupos que continham maior concentração da droga e conservantes, sendo discretamente alterado no grupo livre de conservante. A análise histológica também confirmou esses achados, demonstrando maiores alterações epiteliais conjuntivais e no estroma corneano dos animais tratados com colírios que continham conservantes.

O mesmo grupo de Pisella (2004) publicou estudo cujo objetivo era comparar a toxicidade nas células conjuntivais induzida por latanoprost e timolol com e sem conservante pela expressão de marcadores inflamatórios (HLA-DR, ICAM-1 e mucina). O estudo avaliou material coletado por citologia de impressão e submetido à citometria de fluxo de pacientes glaucomatosos tratados por pelo menos um ano com medicações, comparado a um grupo de indivíduos normais. Para demonstrar efeito pró-inflamatório e apoptótico nas células conjuntivais de humanos submetidas à expansão clonal, a linhagem celular foi tratada com as mesmas medicações adicionando-se um grupo apenas com CBA na concentração de 0,02%, semelhante às drogas avaliadas. Houve maior expressão dos marcadores inflamatórios e redução da mucina nas drogas com conservante, porém essa

ação foi menor no grupo com maleato de timolol e com latanoprostá especialmente, do que do que no grupo que recebeu CBA isoladamente. Esse trabalho sugere um potencial efeito protetor dos análogos das prostaglandinas, e, em menor escala, do timolol, em comparação à toxicidade causada pelo preservativo isoladamente.

Um estudo realizado por Noeckers et al. (2004), avaliou coelhos da raça Nova Zelândia que receberam medicações anti-glaucomatosas tópicas (brimonidina purite 0,15%, bimatoprostá 0,03%, dorzolamida 2%, maleato de timolol 0,5% e latanoprostá 0,005%) e lubrificante (carboximetilcelulose 0,5%) com outro conservante, o purite, por 30 dias. Perda de microvilos e buracos epiteliais na córnea foram descritos em todos os grupos, além de presença de células inflamatórias no estroma e epitélio conjuntival, porém as drogas que continham purite apresentaram as menores alterações. E dentre as drogas que utilizam CBA como conservante, a bimatoprostá, por ter a menor concentração (0,005%), apresentou menores anormalidades córneo-conjuntivais.

Ao contrário da literatura, não observamos infiltrado inflamatório difuso e intenso, nem alterações do colágeno subepiteliais no grupo submetido ao tratamento com lubrificantes contendo CBA. A concentração de CBA na bimatoprostá é a menor dentre as drogas avaliadas no presente estudo (0,005 %). A concentração de CBA no maleato de timolol é de 0,01%, na travoprostá é de 0,015 % e na latanoprostá é 0,02%. O lubrificante contendo conservante que utilizamos em nosso estudo tem concentração de 0,006%. Apenas detectamos uma tendência ao aumento do número de

vasos nesse grupo quando comparado aos olhos controle, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,512$). Essas alterações, entretanto, foram observadas no grupo tratado com maleato de timolol, o que nos leva a supor que a droga em si seja mais tóxica que o conservante em coelhos submetidos a tratamento por curto espaço de tempo.

Alguns fatores podem justificar essa discrepância: o pouco tempo de exposição ao conservante (30 dias), a posologia reduzida (uma gota ao dia), a baixa concentração de CBA (0,006%) a que os animais foram expostos ou ainda sua associação à hipromelose e dextrano 70, que poderia proteger o epitélio conjuntival (Debbasch et al., 2002). Os estudos em geral demonstraram alterações decorrentes da toxicidade a longo prazo (acima de seis meses de uso) (Herreras et al., 1992; Baudouin et al., 1994; Broadway et al., 1994; Mietz et al., 1994; Turacli et al., 1997; Nuzzi et al., 1998; Baudouin et al., 1999), além de utilizarem concentrações maiores de CBA, que variaram de 0,01 % a 0,5 % (Takahashi et al., 1983; Baudouin et al., 1994; Mietz et al., 1994; De Saint Jean et al., 1999; Pisella et al., 2000; Costagliola et al., 2001; Blondin et al., 2003; Pisella et al., 2004; Noeckers et al., 2004).

5.6) Possível efeito protetor das prostaglandinas.

Guenoum et al. (2005) realizaram estudo *in vitro* avaliando três análogos de PG disponíveis comercialmente (bimatoprost, travoprost e latanoprost) para verificar a expressão de marcadores inflamatórios (ICAM-1- molécula de adesão intercelular, PECAM-1 molécula de adesão endotelial de plaquetas e HLA-DR), em culturas de células conjuntivais

epiteliais, além de avaliar viabilidade celular e apoptose. O objetivo também era correlacionar os achados com possível efeito tóxico e inflamatório (como hiperemia ocular, por exemplo), freqüentemente relacionado às drogas em questão. Os autores utilizaram também FNT (fator de necrose tumoral) e CBA em diferentes concentrações. Os resultados surpreenderam, pois as medicações (bimatoprost, latanoprost e travoprost) não induziram a expressão das moléculas inflamatórias e ainda reduziram a expressão de ICAM-1 e PECAM-1 nas soluções que continham CBA em maior concentração.

Subseqüentemente, o mesmo grupo publicou artigo (Guenoum et al., 2005) cuja finalidade era comprovar os possíveis efeitos protetores celulares atribuídos às prostaglandinas disponíveis comercialmente contra a toxicidade do CBA e investigar se haveria algum mecanismo antioxidativo envolvido nos efeitos das prostaglandinas, utilizando-se os mesmos métodos.

Para esse estudo, investigaram-se as três drogas (latanoprost, travoprost e bimatoprost) e CBA nas concentrações de 0,02%; 0,015% e 0,005%. Houve redução da viabilidade celular diretamente proporcional ao aumento da concentração de CBA (toxicidade concentração-dependente). As toxicidades de latanoprost e travoprost (solução comercial) foram significativamente menores que as concentrações de CBA ($p < 0,001$), enquanto a bimatoprost não induziu toxicidade. Com relação ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) as células expostas à latanoprost e travoprost demonstraram redução significativa na detecção dessa substância.

Concluiu-se que latanoprost e travoprost foram responsáveis por efeitos protetores, combatendo a toxicidade causada por CBA, provavelmente mediada por propriedades antioxidantes. A baixa toxicidade de bimatoprost não permitiu revelar essa possível propriedade. Além disso, sugeriu-se que a redução dos metabólitos ativos livres de O_2 possa ser o principal mecanismo de proteção epitelial das prostaglandinas contra os efeitos pró-apoptóticos do cloreto de benzalcônio.

Com relação à viabilidade celular, observou-se maior toxicidade relacionada diretamente ao tempo de exposição à droga, e no caso de CBA, dependendo de sua concentração. Bimatoprost tem a menor concentração de CBA e apresentou a menor toxicidade. Este estudo permitiu concluir que nenhuma das drogas parece estimular diretamente vias inflamatórias que envolvam adesão de moléculas ou antígenos de Classe II. A toxicidade induzida é leve e parece estar relacionada ao CBA, que possivelmente, é o maior responsável a longo prazo. Porém, essas alterações não estão relacionadas com a hiperemia conjuntival inicial e transitória induzida pelos análogos de prostaglandinas.

Em nosso estudo, as alterações conjuntivais causadas pelo maleato de timolol foram mais intensas do que as induzidas por análogos de prostaglandinas, mesmo utilizando-se a mesma unidade posológica (uma gota ao dia), o que reforça o possível efeito protetor destes compostos. Porém, o mesmo não foi observado no grupo tratado apenas com conservante, possivelmente por motivos esclarecidos anteriormente.

A observação do suposto efeito protetor também nos transmite segurança no uso de tais compostos (análogos de prostaglandinas), drogas potentes e que, potencialmente poderiam induzir uma resposta inflamatória maior pelo fato de derivarem de subprodutos do processo inflamatório.

5.7) Considerações finais

Os análogos de prostaglandinas são medicações potentes, que vem sendo empregadas cada vez mais como primeira opção no tratamento do glaucoma.

O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos histomorfométricos dos análogos das prostaglandinas à droga ainda considerada padrão no tratamento do glaucoma no Brasil: maleato de timolol. Devemos nos lembrar que o experimento foi realizado em coelhos e não em humanos, durante período curto, o que limita a generalização de nossos achados.

O que efetivamente podemos afirmar é que, em nosso estudo experimental, os análogos de prostaglandinas demonstraram ser drogas seguras e pouco lesivas à superfície ocular de coelhos quando comparadas a maleato de timolol.

Indubitavelmente, a possibilidade de usar tais compostos com segurança só traz alento à prática médica, pois diariamente enfrentamos o desafio de tratar pacientes com glaucoma e prevenir a instalação da cegueira causada por tão devastadora enfermidade.

Não podemos nos esquecer ainda da resposta individual de cada paciente à droga, dependendo de sua quantidade individual de enzimas, da

biodisponibilidade da droga, da afinidade de receptores e da atividade intrínseca de cada uma delas em cada paciente.

6. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que, em relação às consequências do uso de análogos de prostaglandinas, maleato de timolol e colírio lubrificante contendo cloreto de benzalcônio na conjuntiva de coelhos:

1. Observou-se presença de reação inflamatória conjuntival difusa com predomínio de monomorfonucleares em todos os grupos submetidos a tratamento com anti-glaucomatosos, mais intensa no grupo tratado com maleato de timolol.

2. Observou-se aumento do número de vasos nos grupos submetidos a tratamento com latanoprost e timolol, e redução do diâmetro vascular no grupo tratado com travoprost.

3. Houve aumento do número de células caliciformes inicialmente no grupo tratado com travoprost e, na seqüência, nos coelhos tratados com bimatoprost e latanoprost. O grupo tratado com maleato de timolol apresentou redução do número de células caliciformes.

4. Não houve alteração da espessura do epitélio conjuntival nos grupos submetidos a tratamento com análogos de prostaglandinas e lubrificantes. O grupo usuário de timolol apresentou aumento da espessura epitelial no trigésimo dia de tratamento.

5. Observou-se presença de fibrose subepitelial no grupo tratado com timolol. Não houve alterações desse tipo nos demais grupos.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A: Aprovação da Comissão de Ética

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

AO
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 29.03.05 tomou conhecimento da execução do Protocolo de Pesquisa nº **161/05** - intitulado "Alterações conjuntivais induzidas por análogos das prostaglandinas: Estudo histo-patológico e imunohistoquímico".

No que tange a sua parte empírica, será desenvolvido no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba-PR, tendo seu Comitê de Ética Médica aprovado o protocolo em 02.02.05.

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Vital Paulino Costa

Pesquisador(a) Executante: Sra. Heloisa Helena Abil Russ Giacometti

CAPPesq, 29 de Março de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FBMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Odorico Faria de Campos, 225, 5º andar - CEP 05410-010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30466462 - Fax: 011 - 30466462 - e-mail: cappel@fmc.usp.br / etica@fmc.usp.br

Tabela XII: Peso dos coelhos

	COELHAS N°	PESO (g)
GRUPO 01	1	1800
	2	1900
	3	2030
	4	1970
	5	1980
	6	2065
	7	2005
	8	1925
	9	2090
	10	1915
GRUPO 02	11	2100
	12	2210
	13	1970
	14	2210
	15	2270
	16	2205
	17	2150
	18	2190
	19	2200
	20	2090
GRUPO 03	21	2215
	22	1800
	23	1990
	24	2040
	25	2105
	26	2115
	27	2185
	28	2205
	29	2270
	30	2185
GRUPO 04	31	2200
	32	2052
	33	2025
	34	2065
	35	2095
	36	2000
	37	2170
	38	2155
	39	2120
	40	2190
GRUPO 05	41	2200
	42	1990
	43	2030
	44	2105
	45	2115
	46	1980
	47	2065
	48	1925
	49	2100
	50	1750

Tabela XIII: Células caliciformes no epitélio conjuntival de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Position	Céls caliciformes	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Position	Céls caliciformes	Tempo
1	OD	G1.1.OD.He	1	8	8	1	OS	G1.1.OS.He	1	8	8
1	OD	G1.1.OD.He	1	6	8	1	OS	G1.2.OS.He	1	11	8
1	OD	G1.2.OD.He	1	11	8	1	OS	G1.2.OS.He	1	10	8
1	OD	G1.2.OD.He	1	10	8	1	OS	G1.3.OS.He	1	16	8
1	OD	G1.3.OD.He	1	13	8	1	OS	G1.3.OS.He	1	5	8
1	OD	G1.3.OD.He	1	12	8	1	OS	G1.4.OS.He	1	13	8
1	OD	G1.4.OD.He	1	9	8	1	OS	G1.4.OS.He	1	13	8
1	OD	G1.4.OD.He	1	8	8	1	OS	G1.5.OS.He	1	14	8
1	OD	G1.5.OD.He	1	5	8	1	OS	G1.5.OS.He	1	14	8
1	OD	G1.5.OD.He	1	6	8	2	OS	G2.1.OS.He	1	16	8
2	OD	G2.1.OD.He	1	6	8	2	OS	G2.1.OS.He	1	12	8
2	OD	G2.1.OD.He	1	9	8	2	OS	G2.2.OS.He	1	12	8
2	OD	G2.2.OD.He	1	5	8	2	OS	G2.2.OS.He	1	10	8
2	OD	G2.2.OD.He	1	6	8	2	OS	G2.3.OS.He	1	8	8
2	OD	G2.3.OD.He	1	5	8	2	OS	G2.3.OS.He	1	7	8
2	OD	G2.3.OD.He	1	6	8	2	OS	G2.4.OS.He	1	11	8
2	OD	G2.4.OD.He	1	2	8	2	OS	G2.4.OS.He	1	8	8
2	OD	G2.4.OD.He	1	9	8	2	OS	G2.5.OS.He	1	13	8
2	OD	G2.5.OD.He	1	3	8	2	OS	G2.5.OS.He	1	7	8
2	OD	G2.5.OD.He	1	3	8	3	OS	G3.1.OS.He	1	10	8
3	OD	G3.1.OD.He	1	9	8	3	OS	G3.1.OS.He	1	7	8
3	OD	G3.2.OD.He	1	5	8	3	OS	G3.2.OS.He	1	14	8
3	OD	G3.2.OD.He	1	8	8	3	OS	G3.2.OS.He	1	11	8
3	OD	G3.3.OD.He	1	8	8	3	OS	G3.3.OS.He	1	4	8
3	OD	G3.3.OD.He	1	6	8	3	OS	G3.3.OS.He	1	6	8
3	OD	G3.4.OD.He	1	12	8	3	OS	G3.4.OS.He	1	9	8
3	OD	G3.4.OD.He	1	7	8	3	OS	G3.4.OS.He	1	9	8
3	OD	G3.5.OD.He	1	8	8	3	OS	G3.5.OS.He	1	8	8
3	OD	G3.5.OD.He	1	9	8	3	OS	G3.5.OS.He	1	6	8
4	OD	G4.1.OD.He	1	15	8	4	OS	G4.1.OS.He	1	14	8
4	OD	G4.1.OD.He	1	14	8	4	OS	G4.1.OS.He	1	10	8
4	OD	G4.2.OD.He	1	11	8	4	OS	G4.2.OS.He	1	11	8
4	OD	G4.2.OD.He	1	7	8	4	OS	G4.2.OS.He	1	7	8
4	OD	G4.3.OD.He	1	14	8	4	OS	G4.3.OS.He	1	9	8
4	OD	G4.3.OD.He	1	13	8	4	OS	G4.3.OS.He	1	9	8
4	OD	G4.4.OD.He	1	10	8	4	OS	G4.4.OS.He	1	10	8
4	OD	G4.4.OD.He	1	8	8	4	OS	G4.4.OS.He	1	9	8
4	OD	G4.5.OD.He	1	6	8	4	OS	G4.5.OS.He	1	7	8
4	OD	G4.5.OD.He	1	6	8	4	OS	G4.5.OS.He	1	6	8

Tabela XIV: Células caliciformes no epitélio conjuntival de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Position	Céls caliciformes	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Position	Céls caliciformes	Tempo
1	OD	G1.6.OD.He	1	7	30	1	OS	G1.6.OS.He	1	12	30
1	OD	G1.6.OD.He	1	7	30	1	OS	G1.6.OS.He	1	14	30
1	OD	G1.7.OD.He	1	7	30	1	OS	G1.7.OS.He	1	12	30
1	OD	G1.7.OD.He	1	12	30	1	OS	G1.7.OS.He	1	10	30
1	OD	G1.8.OD.He	1	7	30	1	OS	G1.8.OS.He	1	9	30
1	OD	G1.8.OD.He	1	6	30	1	OS	G1.8.OS.He	1	10	30
1	OD	G1.9.OD.He	1	7	30	1	OS	G1.9.OS.He	1	8	30
1	OD	G1.9.OD.He	1	7	30	1	OS	G1.9.OS.He	1	9	30
1	OD	G1.10.OD.He	1	7	30	1	OS	G1.10.OS.He	1	10	30
1	OD	G1.10.OD.He	1	8	30	1	OS	G1.10.OS.He	1	9	30
2	OD	G2.6.OD.He	1	8	30	2	OS	G2.6.OS.He	1	11	30
2	OD	G2.6.OD.He	1	9	30	2	OS	G2.6.OS.He	1	5	30
2	OD	G2.7.OD.He	1	6	30	2	OS	G2.7.OS.He	1	6	30
2	OD	G2.7.OD.He	1	8	30	2	OS	G2.7.OS.He	1	6	30
2	OD	G2.8.OD.He	1	7	30	2	OS	G2.8.OS.He	1	6	30
2	OD	G2.8.OD.He	1	11	30	2	OS	G2.9.OS.He	1	9	30
2	OD	G2.9.OD.He	1	15	30	2	OS	G2.9.OS.He	1	7	30
2	OD	G2.9.OD.He	1	10	30	2	OS	G2.10.OS.He	1	13	30
2	OD	G2.10.OD.He	1	4	30	2	OS	G2.10.OS.He	1	6	30
2	OD	G2.10.OD.He	1	6	30	3	OS	G3.6.OS.He	1	11	30
3	OD	G3.6.OD.He	1	6	30	3	OS	G3.6.OS.He	1	10	30
3	OD	G3.6.OD.He	1	4	30	3	OS	G3.7.OS.He	1	8	30
3	OD	G3.7.OD.He	1	7	30	3	OS	G3.7.OS.He	1	7	30
3	OD	G3.7.OD.He	1	7	30	3	OS	G3.8.OS.He	1	7	30
3	OD	G3.8.OD.He	1	7	30	3	OS	G3.8.OS.He	1	9	30
3	OD	G3.8.OD.He	1	7	30	3	OS	G3.9.OS.He	1	11	30
3	OD	G3.9.OD.He	1	8	30	3	OS	G3.9.OS.He	1	11	30
3	OD	G3.9.OD.He	1	11	30	3	OS	G3.10.OS.He	1	10	30
3	OD	G3.10.OD.He	1	7	30	3	OS	G3.10.OS.He	1	12	30
3	OD	G3.10.OD.He	1	8	30	4	OS	G4.6.OS.He	1	8	30
4	OD	G4.6.OD.He	1	15	30	4	OS	G4.6.OS.He	1	7	30
4	OD	G4.6.OD.He	1	12	30	4	OS	G4.7.OS.He	1	13	30
4	OD	G4.7.OD.He	1	14	30	4	OS	G4.7.OS.He	1	14	30
4	OD	G4.7.OD.He	1	14	30	4	OS	G4.8.OS.He	1	11	30
4	OD	G4.8.OD.He	1	7	30	4	OS	G4.8.OS.He	1	12	30
4	OD	G4.8.OD.He	1	5	30	4	OS	G4.9.OS.He	1	10	30
4	OD	G4.9.OD.He	1	4	30	4	OS	G4.9.OS.He	1	11	30
4	OD	G4.9.OD.He	1	5	30	4	OS	G4.10.OS.He	1	6	30
4	OD	G4.10.OD.He	1	7	30	4	OS	G4.10.OS.He	1	10	30
4	OD	G4.10.OD.He	1	11	30						

Tabela XV: Espessura epitelial da conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Position	Thickness (µm)	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Position	Thickness (µm)	Tempo
1	OD	G1.1.OD. He	1	10,039	8	1	OS	G1.1.OS. He	1	8,235	8
1	OD	G1.1.OD. He	1	18,995	8	1	OS	G1.1.OS. He	1	5,688	8
1	OD	G1.2.OD. He	1	17,370	8	1	OS	G1.2.OS. He	1	8,712	8
1	OD	G1.4.OD. He	1	12,309	8	1	OS	G1.3.OS. He	1	13,570	8
1	OD	G1.4.OD. He	1	17,424	8	1	OS	G1.4.OS. He	1	16,990	8
3	OD	G3.4.OD. He	1	8,495	8	1	OS	G1.5.OS. He	1	14,544	8
3	OD	G3.5.OD. He	1	8,976	8	2	OS	G2.1.OS. He	1	8,818	8
4	OD	G4.1.OD. He	1	14,285	8	2	OS	G2.1.OS. He	1	10,284	8
4	OD	G4.3.OD. He	1	13,775	8	2	OS	G2.3.OS. He	1	14,544	8
						3	OS	G3.3.OS. He	1	9,530	8
						3	OS	G3.4.OS. He	1	16,241	8
						3	OS	G3.5.OS. He	1	12,718	8
						4	OS	G4.1.OS. He	1	24,565	8
						4	OS	G4.1.OS. He	1	13,409	8
						4	OS	G4.3.OS. He	1	9,756	8
						4	OS	G4.5.OS. He	1	12,718	8
						4	OS	G4.5.OS. He	1	18,413	8

Tabela XVI: Espessura epitelial da conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Position	Thickness (µm)	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Position	Thickness (µm)	Tempo
1	OD	G1.6.OD. He	1	10,101	30	1	OS	G1.6.OS. He	1	16,241	30
1	OD	G1.7.OD. He	1	16,016	30	1	OS	G1.6.OS. He	1	16,469	30
2	OD	G2.8.OD. He	1	11,070	30	1	OS	G1.7.OS. He	1	8,495	30
2	OD	G2.8.OD. He	1	17,424	30	1	OS	G1.7.OS. He	1	14,197	30
2	OD	G2.9.OD. He	1	17,768	30	1	OS	G1.10.OS. He	1	8,676	30
3	OD	G3.7.OD. He	1	8,924	30	2	OS	G2.6.OS. He	1	10,254	30
3	OD	G3.10.OD. He	1	12,471	30	2	OS	G2.6.OS. He	1	11,936	30
4	OD	G4.9.OD. He	1	10,595	30	2	OS	G2.8.OS. He	1	18,295	30
4	OD	G4.10.OD. He	1	11,154	30	3	OS	G3.8.OS. He	1	12,471	30
						3	OS	G3.8.OS. He	1	18,698	30
						3	OS	G3.10.OS. He	1	11,210	30
						4	OS	G4.6.OS. He	1	13,432	30
						4	OS	G4.8.OS. He	1	15,069	30
						4	OS	G4.9.OS. He	1	14,285	30
						4	OS	G4.10.OS. He	1	14,465	30

Tabela XVII: Número de vasos na conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Número de vasos	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Número de vasos	Tempo
1	OD	G1.5	0	8	1	OS	G1.5	5	8
1	OD	G1.01	4	8	1	OS	G1.01	5	8
1	OD	G1.02	1	8	1	OS	G1.02	1	8
1	OD	G1.03	0	8	1	OS	G1.03	0	8
1	OD	G1.04	2	8	1	OS	G1.04	1	8
2	OD	G2.01	0	8	2	OS	G2.01	2	8
2	OD	G2.04	0	8	2	OS	G2.04	1	8
2	OD	G2.05	4	8	2	OS	G2.05	2	8
2	OD	G2.02	2	8	2	OS	G2.02	1	8
2	OD	G2.03	0	8	2	OS	G2.03	2	8
3	OD	G3.05	2	8	3	OS	G3.05	3	8
3	OD	G3.04	1	8	3	OS	G3.04	0	8
3	OD	G3.01	2	8	3	OS	G3.01	1	8
3	OD	G3.02	1	8	3	OS	G3.03	3	8
4	OD	G4.05	0	8	3	OS	G3.02	1	8
4	OD	G4.01	0	8	4	OS	G4.05	3	8
4	OD	G4.02	3	8	4	OS	G4.01	1	8
4	OD	G4.03	2	8	4	OS	G4.02	3	8
4	OD	G4.04	3	8	4	OS	G4.03	2	8
					4	OS	G4.04	5	8

Tabela XVIII: Número de vasos na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Número de vasos	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Número de vasos	Tempo
1	OD	G1.6	2	30	1	OS	G1.6	3	30
1	OD	G1.7	2	30	1	OS	G1.7	5	30
1	OD	G1.8	1	30	1	OS	G1.8	1	30
1	OD	G1.9	1	30	1	OS	G1.9	1	30
1	OD	G1.10	0	30	1	OS	G1.10	9	30
2	OD	G2.07	0	30	2	OS	G2.07	3	30
2	OD	G2.08	3	30	2	OS	G2.08	1	30
2	OD	G2.09	0	30	2	OS	G2.09	3	30
2	OD	G2.10	1	30	2	OS	G2.10	2	30
2	OD	G2.06	0	30	2	OS	G2.06	0	30
3	OD	G3.06	1	30	3	OS	G3.06	7	30
3	OD	G3.07	2	30	3	OS	G3.07	2	30
3	OD	G3.08	0	30	3	OS	G3.08	5	30
3	OD	G3.09	0	30	3	OS	G3.09	2	30
3	OD	G3.10	2	30	3	OS	G3.10	8	30
4	OD	G4.10	2	30	4	OS	G4.10	5	30
4	OD	G4.09	2	30	4	OS	G4.09	3	30
4	OD	G4.07	0	30	4	OS	G4.07	3	30
4	OD	G4.08	1	30	4	OS	G4.08	4	30
4	OD	G4.06	1	30	4	OS	G4.06	4	30

Tabela XIX: Diâmetro vascular na conjuntiva de coelhos após 8 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Diâmetro	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Diâmetro	Tempo
1	OD	G1.01	27,140	8	1	OS	G1.5	18,396	8
1	OD	G1.02	12,320	8	1	OS	G1.5	29,764	8
1	OD	G1.04	9,595	8	1	OS	G1.01	12,320	8
1	OD	G1.04	11,154	8	1	OS	G1.01	11,042	8
2	OD	G2.05	7,340758	8	1	OS	G1.02	12,014	8
2	OD	G2.05	7,003069	8	1	OS	G1.04	20,201	8
2	OD	G2.05	4,982391	8	2	OS	G2.01	20,5677	8
2	OD	G2.02	24,48893	8	2	OS	G2.01	16,46928	8
3	OD	G3.05	17,63666	8	2	OS	G2.05	19,76565	8
3	OD	G3.04	21,2227	8	2	OS	G2.05	21,04608	8
3	OD	G3.01	19,06065	8	2	OS	G2.02	13,38528	8
3	OD	G3.02	14,54356	8	2	OS	G2.03	27,13983	8
4	OD	G4.02	15,85338	8	3	OS	G3.05	14,9652	8
4	OD	.	11,29297	8	3	OS	G3.01	5,687651	8
4	OD	G4.03	12,26984	8	3	OS	G3.03	16,46928	8
4	OD	.	14,10933	8	3	OS	G3.02	21,04608	8
4	OD	G4.04	20,82321	8	4	OS	G4.05	15,85338	8
					4	OS	G4.05	20,74839	8
					4	OS	G4.05	15,85338	8
					4	OS	G4.01	16,24105	8
					4	OS	G4.02	15,15111	8
					4	OS	G4.03	21,29585	8
					4	OS	G4.04	16,58221	8
					4	OS	.	10,10074	8
					4	OS	,	19,40032	8

Tabela XX: Diâmetro vascular na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com análogos de prostaglandinas e maleato de timolol.

Grupo	Olho	Lâmina	Diâmetro	Tempo	Grupo	Olho	Lâmina	Diâmetro	Tempo
1	OD	G1.6	9,198	30	1	OS	G1.6	22,751	30
1	OD	G1.6	15,775	30	1	OS	G1.7	21,223	30
1	OD	G1.7	24,942	30	1	OS	G1.7	11,042	30
1	OD	G1.8	8,044	30	1	OS	G1.9	11,484	30
1	OD	G1.9	11,484	30	1	OS	G1.10	21,046	30
2	OD	G2.08	32,36699	30	1	OS	G1.10	18,396	30
2	OD	G2.08	16,08711	30	2	OS	G2.07	17,98593	30
2	OD	G2.10	23,45079	30	2	OS	G2.07	14,19723	30
3	OD	G3.06	11,07043	30	2	OS	G2.08	11,3753	30
3	OD	G3.07	15,17163	30	2	OS	G2.09	13,00816	30
3	OD	,	15,06877	30	2	OS	G2.10	12,01366	30
3	OD	G3.10	14,19723	30	3	OS	G3.06	35,31738	30
4	OD	G4.10	16,98988	30	3	OS	.	26,44322	30
4	OD	G4.10	23,29107	30	3	OS	.	14,21913	30
4	OD	G4.09	21,97162	30	3	OS	.	36,25609	30
4	OD	G4.08	35,44924	30	3	OS	G3.07	16,87967	30
4	OD	G4.06	21,0017	30	3	OS	.	21,45592	30
					3	OS	G3.08	11,72539	30
					3	OS	.	13,4085	30
					3	OS	G3.09	11,04229	30
					3	OS	G3.10	12,06533	30
					3	OS	.	12,26984	30
					3	OS	.	18,74802	30
					4	OS	G4.10	21,91492	30
					4	OS	G4.10	14,54356	30
					4	OS	G4.10	14,54356	30
					4	OS	G4.09	29,34265	30
					4	OS	G4.07	25,87244	30
					4	OS	G4.07	18,99526	30
					4	OS	G4.08	32,48211	30
					4	OS	G4.08	26,01631	30
					4	OS	G4.06	20,74839	30
					4	OS	.	21,70097	30

Tabela XXI: Células caliciformes na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.

Olho	Lâmina	Céls caliciformes	cont/exp
OD	1D BAK	13	bak
OD	1D BAK	10	bak
OD	2DBAK	8	bak
OD	2DBAK	9	bak
OD	3DBAK	6	bak
OD	3DBAK	5	bak
OD	4DBAK	7	bak
OD	5DBAK	7	bak
OD	6DBAK	4	bak
OD	7DBAK	5	bak
OD	9DBAK	6	bak

Olho	Lâmina	Céls caliciformes	cont/exp
OS	1D BAK	5	bak
OS	1D BAK	5	bak
OS	2BAK	4	bak
OS	3CONT OS	6	cont
OS	3CONT OS	12	cont
OS	4CONT OS	7	cont
OS	5CONT OS	10	cont
OS	6CONT OS	4	cont
OS	7CONT OS	13	cont
OS	9CONT OS	7	cont

Tabela XXII: Espessura epitelial da conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.

Olho	Lâmina	Thickness (µm)	cont/exp
OD	1D BAK	22,99539	bak
OD	1D BAK	14,21913	bak
OD	1D BAK	21,23735	bak
OD	1D BAK	21,81534	bak
OD	1D BAK	21,42691	bak
OD	1D BAK	20,64318	bak
OD	2DBAK	10,58199	bak
OD	2DBAK	17,06295	bak
OD	2DBAK	8,531476	bak
OD	2DBAK	19,25548	bak
OD	2DBAK	21,92911	bak
OD	2DBAK	18,02049	bak
OD	3DBAK	18,56462	bak
OD	3DBAK	21,19336	bak
OD	3DBAK	16,76874	bak
OD	3DBAK	13,77467	bak
OD	3DBAK	10,28385	bak
OD	3DBAK	11,72539	bak
OD	4DBAK	20,83814	bak
OD	4DBAK	18,15805	bak
OD	4DBAK	14,50072	bak
OD	5DBAK	12,471	bak
OD	5DBAK	8,818328	bak
OD	5DBAK	15,97067	bak
OD	6DBAK	14,21913	bak
OD	6DBAK	12,71797	bak
OD	6DBAK	14,19723	bak
OD	7DBAK	16,41252	bak
OD	7DBAK	10,52304	bak
OD	7DBAK	9,49763	bak
OD	9DBAK	16,26019	bak
OD	9DBAK	16,58221	bak
OD	9DBAK	18,00322	bak

Olho	Lâmina	Thickness (µm)	cont/exp
OS	1D BAK	13,77467	bak
OS	1D BAK	15,17163	bak
OS	1D BAK	16,7316	bak
OS	1D BAK	20,15523	bak
OS	1D BAK	23,29107	bak
OS	1D BAK	21,92911	bak
OS	2BAK	16,56344	bak
OS	2BAK	14,2846	bak
OS	2BAK	14,81899	bak
OS	3CONT OS	17,29832	cont
OS	3CONT OS	15,06877	cont
OS	3CONT OS	14,54356	cont
OS	3CONT OS	14,54356	cont
OS	3CONT OS	22,21099	cont
OS	3CONT OS	22,88692	cont
OS	4CONT OS	25,3502	cont
OS	4CONT OS	23,87146	cont
OS	4CONT OS	21,52828	cont
OS	5CONT OS	10,58199	cont
OS	5CONT OS	11,64554	cont
OS	5CONT OS	11,04229	cont
OS	6CONT OS	10,98581	cont
OS	6CONT OS	10,37419	cont
OS	6CONT OS	11,3753	cont
OS	7CONT OS	11,3753	cont
OS	7CONT OS	10,58199	cont
OS	7CONT OS	13,50097	cont
OS	9CONT OS	18,92965	cont
OS	9CONT OS	11,93573	cont
OS	9CONT OS	17,22624	cont

Tabela XXIII: Número de vasos na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.

Olho	Lâmina	Nº vasos	cont/exp
OD	1D BAK	1	bak
OD	2DBAK	2	bak
OD	2DBAK	1	bak
OD	6DBAK	2	bak
OD	9DBAK	7	bak

Olho	Lâmina	Nº vasos	cont/exp
OS	1D BAK	1	bak
OS	3CONT OS	1	cont
OS	6CONT OS	1	cont
OS	7CONT OS	2	cont
OS	9CONT OS	2	cont

Tabela XXIV: Diâmetro vascular na conjuntiva de coelhos após 30 dias de tratamento com lubrificante contendo cloreto de benzalcônio e grupo controle.

Grupo	Lâmina	Diâmetro	N° de vasos/campo
bak	1D BAK	10,37419	2
bak	1D BAK	16,58221	
bak	1D BAK		
bak	2D BAK	16,18349	4
bak	2D BAK	12,01366	
bak	2D BAK	23,7277	
bak	2D BAK		
bak	3D BAK	12,471	2
bak	3D BAK	15,79441	
bak	3D BAK		
bak	4D BAK	13,05589	5
bak	4D BAK	16,58221	
bak	4D BAK	13,56991	
bak	4D BAK	16,93486	
bak	5D BAK	8,711866	5
bak	5D BAK	8,818328	
bak	5D BAK	11,64554	
bak	5D BAK	8,043553	
bak	5D BAK	9,198155	
bak	5D BAK		
bak	6 E BAK	9,627741	5
bak	6D BAK	10,28385	2
bak	6D BAK	17,06295	
bak	6D BAK		
bak	7 E BAK	8,494939	
bak	7D BAK	19,48032	7
bak	7D BAK	15,15111	
bak	7D BAK	16,46928	
bak	7D BAK	19,73415	
bak	7D BAK	18,41321	
bak	7D BAK		
bak	7D BAK	29,9304	6
bak	7D BAK	17,37009	
bak	7D BAK	13,77467	
bak	7D BAK	20,10888	
bak	7D BAK	15,97067	
bak	7D BAK	17,02645	
bak	7D BAK		
bak	8 E BAK	6,160219	
bak	9 E BAK	6,358987	
bak	9D BAK	8,818328	4
bak	9D BAK	11,85729	
bak	9D BAK	10,95746	
bak	9D BAK	10,28385	
bak	9D BAK		
bak	10 E BAK	7,440914	
bak	11 E BAK		

Grupo	Lâmina	Diâmetro	N° de vasos/campo
cont	1E cont	25,75193	4
cont	1E cont	26,45499	
cont	1E cont	14,73479	
cont	1E cont	16,56344	
cont	1E cont		
cont	1E CONT	19,90678	2
cont	1E CONT	18,61482	
cont	1E CONT		
cont	2E cont	10,72796	3
cont	2E cont	12,32044	
cont	2E cont	10,28385	
cont	2E cont		
cont	3E CONT	11,1544	4
cont	3E CONT	10,37419	
cont	3E CONT	18,15805	
cont	3E CONT		
cont	4E CONT	11,21003	5
cont	4E CONT	9,49763	
cont	4E CONT	13,38528	
cont	4E CONT	9,9768	
cont	4E CONT		
cont	5E cont	13,77467	3
cont	5E cont	13,79723	
cont	5E cont	10,72796	
cont	5E cont		
cont	6E CONT	13,05589	7
cont	6E CONT	18,00322	
cont	6E CONT	9,198155	
cont	6E CONT	16,24105	
cont	6E CONT	15,55629	
cont	6E CONT		
cont	9E CONT	11,83103	4
cont	9E CONT	10,58199	
cont	9E CONT	14,73479	
cont	9E CONT	15,15111	
cont	9E CONT		

8. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Abib FC. *Tefo 2003-2004 – Terapêutica Farmacológica em Oftalmologia*. 3ª ed, Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2003. p. 181-4, 246-9, 287-90, 317-8.
2. Abrams DA, Robin AL, Pollack IP. The safety and efficacy of topical 1% ALO 2145 (p-aminoclonidine hydrochloride) in normal volunteers. *Arch Ophthalmol*. 1987; 105:1205.
3. Addicks EM, Quigley HA, Green WR, Robin AL. Histologic characteristics of filtering blebs in glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol*. 1983; 101 (5):795-8.
4. Adkins JC, Balfour JA. Brimonidine. A review of its pharmacological properties and clinical potential in the management of open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 1998;12(3):225-41.
5. Alexander CL, Miller SJ, Abel SR. Prostaglandin analogue treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Ann Pharmacother*. 2002; 36:504-11.
6. Alm A. Prostaglandin derivatives as ocular hypotensive agents. *Prog Retin Eye Res*. 1998; 17:291-312.
7. Alm A, Villumsen J. PhXA34, a new potent ocular hypotensive drug. A study on dose-response relationship and on aqueous humor dynamics in healthy volunteers. *Arch Ophthalmol*. 1991; 109:1564-8.

8. Alm A, Stjernschantz J. Effects on intraocular pressure and side effects of 0,005% latanoprost applied once daily, evening or morning: a comparison with timolol. Scandinavian Latanoprost Study Group. *Ophthalmology*. 1995; 102:1743-1752.
9. Al-Shahwan S, Al-Torbak AA, Turkmani S, Al- Omran M, Al-Jadaan I, Edward DP. Side effect profile of brimonidine tartrate in children. *Ophthalmology*. 2005; 112 (12): 2143-5.
10. Aragona P, Candela V, Caputi AP, Micali A, Puzzolo D, Quintieri M. Effects of a stable analogue of PG E2 on the secretory processes of conjunctival goblet cells of rabbit. *Exp Eye Res*. 1987; 45(5):647-654.
11. Arcieri ES, Santana A, Rocha FN, Guapo GL, Costa VP. Blood-aqueous barrier changes after the use of prostaglandin analogues in patients with pseudophakia and aphakia: a 6-month randomized trial. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123(2): 186-92.
12. Ayyala RS, Cruz DA, Margo CE, Harman LE, Pautler SE, Misch DM. Cystoid macular edema associated with latanoprost in aphakic and pseudophakic eyes. *Am J Ophthalmol*. 1998; 126:602-4.
13. Arici MK, Arici DS, Topalkara A, Guler C. Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2000, 28 (2): 113-7.

14. Balfour JA, Wilde MI. Dorzolamide. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 1997;10(5):384-403.
15. Barsam PC. Comparison of the effect of pilocarpina and echothiophate on intraocular pressure and outflow facility. *Am J Ophthalmol*. 1972; 73: 742.
16. Baudouin C, Garcher C, Haouat N, Bron A, Gastaud P. Expression of Inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. *Ophthalmology*. 1994; 101:454-60.
17. Baudouin C. Mechanisms of failure in glaucoma filtering surgery: a consequence of antiglaucomatous drugs? *Int J Clin Pharmacol Res*. 1996; 16(1):29-41.
18. Baudouin C. Side effects of antiglaucomatous drugs on the ocular surface. *Curr Opin Ophthalmol*. 1996; 7(2):80-6.
19. Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, Bechetoille A. Ocular Surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs. *Ophthalmology*. 1999; 106:556-63.
20. Bandouin C, Hamard P, Liang H, Creuzit-Garcher C, Bensoussan L, Brignole F. Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology*. 2004; 111(12): 2186-92.

21. Becker B. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor: Diamox. *Am J Ophthalmol.* 1954; 37: 13-5.
22. Becker B, Gage T. Demecarium bromide and echothiophato iodide in chronic glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1960; 63: 126-31.
23. Bensoussan L, Blondin C, Baudouin C, Hamard P, Sabeh Afaki G, Creuzot-Garcher C, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. Flow cytometric analysis of HLA-DR, IL-6 and IL-8 expression by conjunctival epithelial cells from patients with prolonged topical antiglaucoma treatments. *J Fr Ophtalmol.* 2003; 26(8):782-9.
24. Bernstein P. A comparison of latanoprost, bimatoprost and travoprost in patients with elevated intra-ocular pressure: a 12-week, randomized, masked-evaluator, multicenter study. Comment letter. *Am J Ophthalmol.* 2003; 137(2): 387-388.
25. Berrospi R, Leibowitz HM. Betaxolol: a new beta-adrenergic blocking agent for treatment of glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 1982; 100: 943-70.
26. Bill A. The aqueous humor drainage mechanism in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) with evidence for unconventional routes. *Invest Ophthalmol.* 1965; 4:911-9.
27. Bill A, Hellsing K. Production and drainage of aqueous humor in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*). *Invest Ophthalmol.* 1965; 4:920-6.

28. Bito LZ. A new approach to the medical management of glaucoma, from the bench to the clinic, and beyond: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42:1126-33.
29. Blondin C, Hamard P, Cholley B, Haeffner-Cavaillon N, Baudouin C. In vitro effects of preserved or preservative-free antiglaucoma medications on human complement system. *Curr Eye Res*. 2003; 27(4):253-9.
30. Bowman Rj, Cope J, Nischal KK. Ocular and systemic side effects of brimonidine 0, 2% eye drops (Alphagan) in children. *Eye*. 2004; 18(1): 24-6.
31. Brandt JD, Wittpenn JR, Katz J, Steinmann WN, Spaeth GL. Conjunctival impression cytology in patients with glaucoma using long-term topical medication. *Am J Ophthalmol*. 1991; 112:297-301.
32. Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112:1437-1454.
33. Broadway DC, Grierson L, Sturmer J, Hitchings RA. Reversal of topical antiglaucoma medication effects on the conjunctiva. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114(3):262-7.
34. Butler P, Mannschreck M, Lin S. Clinical experience with the long term use of 1% apraclonidine. *Arch Ophthalmol*. 1995; 113:293-8.

35. Campbel WB, Halushka PV. Prostaglandins. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G., eds. Goodman & Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York: Mac-Graw Hill;1996. cap 26, p 1126-38.
36. Camras CB. Comparison of latanoprost and timolol in patients with ocular hypertension and glaucoma: a six-month masked, multicenter trial in the United States. The United States Latanoprost Study Group. *Ophthalmology*. 1996; 103:138-47.
37. Carlsen JO, Zabriskie NA, Kwon YH, Barbe ME, Scott WE. Apparent central nervous system depression in infants after the use of topical brimonidine. *Am J Ophthalmol* .1999; 128:255-6.
38. Cashwell LF, Shields MB, Reed JW. Adenochrome pigmentation. *Arch Ophthalmol*. 1977, 95:514-8.
39. Cellini M, Caramazza R; Bonsanto D, Bernabini B, Campos EC. Prostaglandin analogs and blood-aqueous barrier integrity: a flare cell meter study. *Ophthalmologica*. 2004; 218(5):312-7.
40. Chen CS, Wells J, Craig JE. Topical prostaglandin F(2 alpha) analog induced poliosis. *Am J Ophthalmol*. 2004; 137:965-6.
41. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*. 1994: 46:205-29.

42. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. *Am J Ophthalmol*. 1998; 126:487-505.
43. Consenso Brasileiro de Glaucoma de Ângulo Aberto (2:2005). Sociedade Brasileira de Glaucoma. São Paulo-Brasil: Editora PlanMark; 2005.p 9-14.
44. Costa VP, Wilson RP, Azuara-Blanco A. Medical Therapy. In. Azuara-Blanco A, Costa VP, Wilson RP. *Handbook of Glaucoma*. London-United Kingdom: Editora Martin Dunitz Ltda; 2002.p 101-11.
45. Costagliola C, Prete AD, Incorvaia C, Fusco R, Parmeggiani F, Di Giovanni A. Ocular surface changes induced by topical application of latanoprost and timolol: a short-term study in glaucomatous patients with and without allergic conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001; 239(11):809-14.
46. Crawford K, Kaufman PL. Pilocarpine antagonizes prostaglandin F₂ alpha-induced ocular hypotension in monkeys. Evidence for enhancement of Uveoscleral outflow by prostaglandin F₂ alpha. *Arch Ophthalmol*. 1987; 105:1112-6.
47. Crawford K, Kaufman PL, Gabelt BT. Effects of topical PGF₂ alpha on aqueous humor dynamics in cynomolgus monkeys. *Curr Eye Res*. 1987; 6:1035-44.

48. Cvenkel B, Ihan A. Ocular surface changes induced by topical antiglaucoma monotherapy. *Ophthalmologica*. 2002; 216(3):175-9.
49. Cvetkovic RS, Perry CM. Brinzolamide: a review of its use in the management of primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 2003;20(12):919-47.
50. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin-gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunology*. 1999; 162:6233-37.
51. Debbasch C, De La Salle SB, Brignole F, Rat P, Warnet JM, Baudouin C. Cytoprotective effects of hyaluronic acid and carbomer 934P in ocular surface epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43(11):3409-15.
52. De Saint Jean M, Brignole F, Bringuier AF. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:619-630.
53. De Saint Jean M, Debbasch C, Brignole F, Rat P, Warnet JM, Baudouin C. Toxicity of preserved and unpreserved antiglaucoma topical drugs in an in vitro model of conjunctival cells. *Curr Eye Res*. 2000; 20(2):85-94.
54. Drance DM, Ross RA. The ocular effects of epinephrine. *Surv Ophthalmol*. 1970; 14: 330-5.

55. Drance SM, Nash PA. The dose response of human intraocular pressure to pilocarpine. *Can J Ophthalmol*. 1971; 6: 9-13.
56. Easthope SE, Perry CM. Topical bimatoprost: a review of its use in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 2002; 19:231-48.
57. Eisenberg DL, Toris CB, Camras CB. Bimatoprost and travoprost: a review of recent studies of two new glaucoma drugs. *Surv Ophthalmol*. 2002; 47 (1):105-15.
58. Feldman RM. Conjunctival hyperemia and the use of topical prostaglandins in glaucoma and ocular hypertension. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2003; 19 (1):23-35.
59. Fellman RL, Starita RJ. Ocular and systemic side effects of topical cholinergic and anticholinesterase drugs. In: Sherwood MB, Spaeth GL. *Complications of Glaucoma Therapy*. Thorofare, USA: Slack Incorporated: 1990. p 5-18.
60. Fiore PM, Jacobs IH, Goldbert DB. Drug-induced pemphigoid. A spectrum of diseases. *Arch Ophthalmol*. 1987, 105:1660-5.
61. Feldman RM. Conjunctival hyperemia and the use of topical prostaglandins in glaucoma and ocular hypertension. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2003; 19(1):23-35.

62. Gabelt BT, Kaufman PL. Prostaglandin F2 alpha increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res.* 1989; 49:389-402.
63. Gabelt BT, Kaufman PL. The effect of prostaglandin F2 alpha on trabecular outflow facility in cynomolgus monkeys. *Exp Eye Res.* 1990; 51:87-91.
64. Gandolfi S, Simmons ST, Sturm R, Chen K, Vandenberg AM: Bimatoprost Study Group 3. Three-month comparison of bimatoprost and latanoprost in patients with glaucoma and ocular hypertension. *Adv Ther.* 2001;18:110-21.
65. Goldberg I, Cunha-Vaz J, Jakobsen JE, Nordmann JP, Trost E. Sullivan EK: International Travoprost Study Group. Comparison of topical travoprost eye drops given once daily and timolol 0,5% given twice daily in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *J Glaucoma.* 2001;10:414-22.
66. Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD. The ocular hypertension treatment study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120:714-720.
67. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. In vitro study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, travoprost, and bimatoprost in conjunctiva –derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:2444-2450.

68. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:4594-4599.
69. Grierson I, Lee WR, Abraham S. Effects of pilocarpina on the morphology of the human outflow apparatus. *Br J Ophthalmol* 1978; 62: 302.
70. Guglielminetti E, Barabino S, Monaco M, Mantero S, Rolando M. HLA-DR expression in conjunctival cells after latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2002; 18(1):1-9.
71. Hamard P, Blondin C, Debbasch C, Warnet JM, Baudouin C, Brignole F. In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2003; 241(12):1037-43.
72. Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973; 70:899-903.
73. Hedman K, Alm A. A pooled-data analysis of three randomized, double-masked, six-month clinical studies comparing the intraocular pressure reducing effect of latanoprost and timolol. *Eur J Ophthalmol.* 2000; 10:95-104.

74. Heijl A, Leski MC, Bengtsson B, Hyman L, Hussein M for the Early Manifest Glaucoma Trial Group. Reduction of Intraocular Pressure and Glaucoma Progression. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120:1268-1279.
75. Herreras JM, Pastor JC, Calonge M, Asensio VM. Ocular surface alteration after long-term treatment with antiglaucomatous drug. *Ophthalmology*. 1992; 99 (7):1082-8.
76. Higginbotham EJ, Schuman JS, Goldberg I, Gross RL, Van denburgh AM, Chen K, Whitcup SM. One-year, randomized study comparing bimatoprost and timolol in glaucoma and ocular hypertension – The Bimatoprost study group. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120(10): 1286-93.
77. Hodapp E, Kolker AE, Kass MA. The effect of topical clonidine on intraocular pressure. *Arch Ophthalmol*. 1981; 99: 1208-12.
78. Horton EW. Prostanoids in health and disease. In: Roberts SM, Scheinmann F. *Chemistry, Biochemistry and Pharmacological Activity of Prostanoids*. Oxford: Pergamon Press; 1979. p.1-16.
79. Hoyng PF, van Beek LM. Pharmacological therapy for glaucoma: a review. *Drugs*. 2000; 59(3): 411-34.
80. Hung PT, Hsieh JW, Chiou GCY. Ocular hypotensive effects of N-demethylated carbachol on open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1982; 100: 262.

81. Ihan A, Cvenkel B. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in glaucoma patients and its influence on the outcome of filtration surgery. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84 (6):648-50.
82. Jackson WB. Differentiating conjunctivitis of diverse origins. *Surv Ophthalmol.* 1993, 38:91-97.
83. Johnstone MA. Hypertrichosis and Increased pigmentation of eyelashes and adjacent hair in the region of the ipsilateral eyelids of patients treated with unilateral topical latanoprost. *Am J Ophthalmol.* 1997; 124(4):544-547.
84. Joyce PW, Mills KB, Richardson T, Mawer GE. Equivalence of conventional and sustained release oral dosage formulations of acetazolamide in primary open angle glaucoma. *Br J Clin Pharmacol.* 1989;27:597-613.
85. Kaback MB, Podos SM, Hargin TS Jr. The effects of dipivalyl epinephrine on the eye. *Am J Ophthalmol.* 1976; 81: 768.
86. Kass MA, Mandell AL, Goldberg I. Dipivefrin and epinephrine treatment of elevated intraocular pressure. A comparative study. *Arch Ophthalmol.* 1979; 97: 1865-6.
87. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120:701-713.

88. Katz LJ. Brimonidine tartrate 0, 2% twice daily vs timolol 0,5% twice daily: 1-year results in glaucoma patients. *Am J Ophthalmol.* 1999; 127: 20-6.
89. Kaufman PL, Barany EH. Residual pilocarpine effects on outflow facility after ciliary muscle disinsertion in the *cynomolgus* monkey. *Invest Ophthalmol.* 1976; 15:558.
90. Kook MS, Lee K. Increased eyelid pigmentation associated with use of latanoprost. *Am J Ophthalmol.* 2000; 129(6):804-806.
91. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. In: *Cornea*. St Louis: Mosby; 1997. chap1:41-47.
92. Krieglstein GK, Langham ME, Leydhecker W. The peripheral and central neural actions of clonidine in normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol.* 1978; 17: 149-53.
93. Lark KK, Pasha AS, Yan X, Edward DP. The effect of latanoprost and brimonidine on rabbit subconjunctival fibroblasts. *J Glaucoma.* 1999; 8(1): 72-6.
94. Lavin MJ, Wormald RPL, Migdal CS, Hitchings RA. The influence of prior therapy on the success of trabeculectomy. *Arch Ophthalmol.* 1990; 108:1543-8.

95. Leske MC, Heijl A, Hyman L, Bengtsson B. Early Manifest Glaucoma Trial- Design and Baseline Data. *Ophthalmology*. 1999; 106(11):2144-53.
96. Lichter PR. Reducing side effects of carbonic anhydrase inhibitors. *Ophthalmology*. 1981;88:266-73.
97. Lichter P, Musch D, Gillespie BW, Guire KE, Janz NK, Wren PA, Mills RP. Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma treatment study comparing initial treatment randomized to medications or surgery. *Ophthalmology*. 2001; 108(11):1943-53.
98. Liesegang TJ. Bulbar conjunctival follicles associated with dipivefrin therapy. *Ophthalmology*. 1985; 92:228-32.
99. Lima MC, Paranhos Júnior A, Salim S, Honkanen R, Devgan L, Wand M et al. Visually significant cystoid macular edema in pseudophakic and aphakic patients with glaucoma receiving latanoprost. *J Glaucoma*, 2000; 9 317-21.
100. Linden C. Therapeutic potential of prostaglandin analogues in glaucoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001; 10(4):679-94.
101. Mandell AI, Stentz F, Kitabchi AE. Dipivalyl epinephrine: a new pro-drug in the treatment of glaucoma. *Ophthalmology* 1978; 85:268.

102. Mathias CGT, Maibach HI, Irvine A, Adler W. Allergic contact dermatitis to echotiophate iodide and phenylephrine. *Arch Ophthalmol.* 1979; 97:286-92.
103. McMahon CD, Shaffer RN, Hoskins HD, Hetherington J Jr. Adverse effects experienced by patients taking timolol. *Am J Ophthalmol.* 1979;88:736-41.
104. Melamed S, David R. Ongoing clinical assessment of the safety profile and efficacy of brimonidine compared with timolol:year-three results. Brimonidine Study Group II. *Clin Ther.* 2000;22(1):103-11.
105. Michels RG, Maumenee E. Cystoid macular edema associated with topically applied epinephrine in aphakic eyes. *Am J Ophthalmol* 1975; 80: 379-88.
106. Mietz H, Niesen U, Krieglstein GK. The effects of preservatives and antiglaucomatous medication on histopathology of the conjunctiva. *Graefes'Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1994; 232:561-565.
107. Mietz H, Shlotzer-Schrehardt U, Strassfeld C, Krieglstein GK. Effect of latanoprost and timolol on the histopathology of the rabbit conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:679-687.
108. Mietz H, Esser JM, Welsandt G, Kociok N, Hueber A, Esser P, Krieglstein GK. Latanoprost stimulates secretion of matrix metalloproteinases in tenon fibroblasts both in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(12):5182-8.

109. Miyake K, Ota I, Maekubo K, Ichihashi S, Miyake S. Latanoprost accelerates disruption of the blood-aqueous barrier and the incidence of angiographic cystoid macular edema in early postoperative pseudophakias. *Arch Ophthalmol*. 1999; 117:34-40.
110. Moreno M, Villena A, Cabarga C, Sanchez-Font E, Garcia-Campos J. Impression cytology of the conjunctival epithelium after anti-glaucomatous treatment with latanoprost. *Eur J Ophthalmol*. 2003; 13(6):553-559.
111. Moroi SE, Gottfredsdottir MS, Schteingart MT, Elner SG, Lee CM, Schertzer RM, et al. Cystoid macular edema associated with latanoprost therapy in a case series of patients with glaucoma and ocular hypertension. *Ophthalmology*. 1999; 106:1024-9.
112. Murray A, Johnstone MD. Hyertrichosis and Increased pigmentation of eyelashes and adjacent hair in the region of the ipsilateral eyelids of patients treated with unilateral topical latanoprost. *Am J Ophthalmol*. 1997; 124(4):544-547.
113. Musch DC, Lichter PR, Guire KE, Standardi CL. The Collaborative Initial Glaucoma Study: study design, methods, and baseline characteristics of enrolled patients. *Ophthalmology*. 1999; 106 (4):653-62.
114. Nenciu A, Stefan C, Ardelean C. Structural and immunohistochemical changes of conjunctiva induced by topical glaucoma medication. *Oftalmologia*. 2004; 48(1):35-42.

115. Netland PA, Landry T, Sullivan EK, Andrew R, Silver L, Weiner A, et al. Travoprost compared with latanoprost and timolol in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Am J Ophthalmol.* 2001; 132:472-84.
116. Nguyen QH. The role of prostaglandin analogues in the treatment of glaucoma in the 21st century. *Int Ophthalmol Clin.* 2004; 44:15-27.
117. Nilsson SF, Samuelsson M, Bill A, Stjernschantz J. Increased uveoscleral outflow as a possible mechanism of ocular hypotension caused by prostaglandin F2 alpha-1-isopropylester in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res.* 1989; 48:707-16.
118. Noeckers RS, Dirks MS, Choplin N. Comparison of latanoprost, bimatoprost and travoprost in patients with elevated intra-ocular pressure: a 12-week, randomized, masked-evaluator multicenter study. *Am J Ophthalmol.* 2003; 137(1):210-11.
119. Noecker RJ, Herrygers L, Anwaruddin R. Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea.* 2004; 23(5),490-496.
120. Nordmann JP, Mertz B, Yannoulis NC, Schwenninger C, Kapik B, Shams N. Unoprostone Monotherapy Study Group-Eu. A double-masked randomized comparison of the efficacy and safety of unoprostone with timolol and betaxolol in patients with primary open-

angle glaucoma including pseudoexfoliation glaucoma or ocular hypertension. 6 month data. *Am J Ophthalmol*. 2002; 133:1-10.

121. Novak GD. Ophthalmic beta-blockers since timolol. *Surv Ophthalmol* 1987; 31: 307-27.
122. Nuzzi R, Vercelli A, Finazzo C, Cracco C. Conjunctival and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1995, 233 (3): 154-62.
123. Nuzzi R, Finazzo C, Cerruti A. Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva and the lachrymal response. *Int Ophthalmol*. 1998; 22(1):31-5.
124. Ocklind A. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res*. 1998; 67:179-91.
125. Parrish RR, Palmberg P, Sheu WP. A comparison of latanoprost, bimatoprost and travoprost in patients with elevated intra-ocular pressure: a 12-week, randomized, masked-evaluator, multicenter study. *Am J Ophthalmol*. 2003; 135(5):688-703.
126. Patten JT, Cavanagh HD, Allansmith MR. Induced ocular pseudopenphigoid. *Am J Ophthalmol*. 1976,82:272-7.

127. Perry CM, McGavin JK, Culy CR, Ibbotson T. Latanoprost: an update of its use in glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging*. 2003; 20: 597-630.
128. Pisella PJ, Fillacier K, Elena PP, Debbasch C, Baudouin C. Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalmic Res*, 2000, 32 (1):3-8.
129. Pisella PJ, Debasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, Baudouin C. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol :an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45(5):1360-1368.
130. Prata Junior JA, Reys JC. Uso prolongado de colírios antiglaucomatosos e eficácia da trabeculectomia. *Arq Bras Oftalmol*. 1993;56(2):97-101.
131. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol*. 1996; 80:389-393.
132. Quigley HA, Vitale S. Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38:83-91.
133. Radius RL, Diamond GR, Polak IP, Langham ME. Timolol: a new drug for management of chronic simple glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1978; 96:1003-10.

134. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.164-88.
135. Reichert RW, Shields MB, Tewart WC. Intraocular pressure response to replacing pilocarpine with carbachol. *Am J Ophthalmol*.1988; 106:747.
136. Reiss GR, Brubaker RF. The mechanism of betaxolol: a new ocular hipotensive agent. *Ophthalmolol*. 1983; 90:1369-73.
137. Resnikoff S, Pascolini D, Etyale D, Kocur I, Pararajasegaram, Pokharel G e Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organization*. 2004; 82(11):844-851.
138. Romano A, Barishak R, Stein R. Obstruction of lacrimal puncta caused by topical epinephrine. *Ophthalmologica*. 1973, 166:301-5.
139. Sagara T, Gatton DD, Lindsey JD, Gabelt BT, Kaufman PL, Weinreb RN. Topical prostaglandin F2 alpha treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. *Arch Ophthalmol*. 1999; 117:794-801.
140. Scarpi M. Olho Seco. In: Belfort Jr R, Kara-José N..*Córnea-Clínica e Cirúrgica*. São Paulo: Roca; 1996. cap(25):285-299.
141. Selen G, Stjernschantz J, Resul B. Prostaglandin-induced iridial pigmentation in primates. *Surv Ophthalmol*. 1997; 41 Suppl 2:S125-8.

142. Sharif NA, Davis TL, Williams GW. [3H]AL-5848 ([3H]9beta-(+)-Fluprostenol). Carboxylic acid of travoprost (AL-6221), a novel FP prostaglandin to study the pharmacology and autoradiographic localization of the FP receptor. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51:685-94.
143. Sherwood MB, Grierson I, Millar L, Hitchings RA. Long term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctival and Tenon`s capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology.* 1989; 96:327-35.
144. Sherwood M, Brandt J, Bimatoprost Study Groups 1 and 2. Six-month comparison of bimatoprost once-daily and twice-daily with timolol twice-daily in patients with elevated intraocular pressure. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45(4):361-8.
145. Shields MB. Cholinergic Stimulators. *In:* M. Bruce Shields. *Textbook of glaucoma*, 4th edition. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins; 1998. Chap.25:384-97.
146. Shields MB. Adrenergic stimulators. *In:* M. Bruce Shields. *Textbook of glaucoma*, 4th edition. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins; 1998. Chap 26:398-412.
147. Shields MB. Adrenergic inhibitors. *In:* M. Bruce Shields. *Textbook of glaucoma*, 4th edition. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins; 1998. Chap 27:413-30.

148. Shields MB. Carbonic anhydrase inhibitors. *In*: M. Bruce Shields. *Textbook of glaucoma*, 4th edition. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins; 1998. Chap 28:431-9.
149. Silver LH. The brinzolamide Primary Therapy Study Group. Clinical efficacy and safety of brinzolamide, a new topical carbonic anhydrase inhibitor for primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *Am J Ophthalmol*. 1998; 126: 400-8.
150. Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol*. 2005;89:1655-9.
151. Smith DL, Skuta GL, Kincaid MC, Rabbani R, Cruess DF, Kao SF. The effects of glaucoma medications on Tenon's capsule and conjunctiva in the rabbit. *Ophthalmic Surg*, 1991; 22 (6): 336-40.
152. Sonntag JR, Brindley GO, Shields MB. Timolol and epinephrine. Comparison of efficacy and side effects. *Arch Ophthalmol*. 1979; 92: 273-9.
153. Sponsel WE, Paris G, Trigo Y, Pena M. Comparative effects of latanoprost (Xalatan) and unoprostone (Rescula) in patients with open-angle glaucoma and suspected glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2002; 134:552-9.
154. Stewart WC, Kolker AE, Stewart JA, Leech J, Jackson AL. Conjunctival hyperemia in healthy subjects after short-term dosing with latanoprost, bimatoprost, and travoprost. *Am J Ophthalmol*. 2003; 135(3):314-20.

155. Steuhl KP, Knorr M, Frohn A, Thiel HJ. Effect of anti-glaucoma eyedrops on cell differentiation of the conjunctiva. *Fortschr Ophthalmol.* 1991; 88 (6) 865-9.
156. Strahlman E, Tipping R, Vogel R. The International Dorzolamide Study Group. A double-masked, randomized, 1-year study comparing dorzolamide, timolol, and betaxolol. *Arch Ophthalmol.* 1995; 113: 1009-16.
157. Takahashi N. A new method evaluating quantitative time-dependent cytotoxicity of ophthalmic solutions in cell culture. Beta-adrenergic blocking agents. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1983, 220(6): 264-7.
158. Tamm E, Rittig M, Lutjen-Drecoll E. Electron microscopy and immunohistochemical studies of the intraocular pressure lowering effect of prostaglandin F2 alpha. *Fortschr Ophthalmol.* 1990; 87:623-9.
159. Tauber J, Melamed S, Foster CS. Glaucoma in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology.* 1989;96:33-7.
160. Tezel G, Siegmund KD, Trinkaus K, Wax MB, Kass MA, Kolker AE. Clinical factors associated with progression of glaucomatous optic disc damage in treated patients. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119(6):813-8.
161. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The Relationship between control of intraocular pressure and visual field

- deterioration. The Agis Investigators. *Am J Ophthalmol.* 2000; 130(4):429-440.
162. Thygesen J, Aaen K, Theodorsen F, Kessing SV, Prause JU. Short-term effect of latanoprost and timolol eye drops on tear fluid and the ocular surface in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Acta Ophthalmol Scand.* 2000; 78:37-44.
163. Thylefors B. A global initiative for the elimination of avoidable blindness. *Am J Ophthalmol.* 1998; 125(1):90-93.
164. Tomimatsu P, Belfort Jr R. Microbiologia e Citologia da córnea. In: Belfort Jr R, Kara-José N. *Córnea-Clínica e Cirúrgica.* São Paulo:Roca. 1996; (7)65-80.
165. Toris CB, Camras CB, Yablonski ME. Effects of PhXA41, a new prostaglandin F2 alpha analog, on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmology.* 1993; 100:1297-304.
166. Toris CB, Yablonski ME, Wang YL, Hayashi M. Prostaglandin A2 increases uveoscleral outflow and trabecular outflow facility in the cat. *Exp Eye Res.* 1995; 61:649-57.
167. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology.* 1985; 92:728-733.
168. Tsukamoto H, Noma H, Mukai S, Ikeda H, Mishima HK. The efficacy and ocular discomfort of substituting brinzolamide for dorzolamide in

combination therapy with latanoprost, timolol, and dorzolamide. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2005; 21(5):395-9.

169. Turacli E, Budak K, Kaur A, Mizrak B, Ekinici C. The effects of long term topical glaucoma medication on conjunctival impression cytology. *Int Ophthalmol.* 1997;21 (1):27-33
170. Van Buskirk EM. Corneal anesthesia after timolol maleate therapy. *Am J Ophthalmol* 1979; 88:739-43.
171. Wand M, Gaudio AR. Cystoid macular edema associated with ocular hypotensive lipids. *Am J Ophthalmol.* 2002; 133:403-5.
172. Wand M, Shields BM. Cystoid macular edema in the era of ocular hypotensive lipids. *Am J Ophthalmol.* 2002; 133:393-7.
173. Wandel T, Spinak M. Toxicicity of dipivalyl epinephrine. *Ophthalmology.* 1981, 88:259-65.
174. Waugh J, Jarvis B. Travoprost. *Drugs Aging.* 2002; 19:465-71; discussion 472-3.
175. Warwar RE, Bullock JD, Ballal D. Cystoid macular edema and anterior uveitis associated with latanoprost use. Experience and incidence in a retrospective review of 94 patients. *Ophthalmology.* 1998; 105:263-8.
176. Watanabe K, Hayasaka S, Hayasaka Y, Nagaki Y, Watanabe K. Cystoid macular edema associated with latanoprost use in a

pseudophakic eye with a history of surgical complications. *Jpn J Ophthalmol.* 2003; 47:110-2.

177. Watson P, Stjernschantz J. A six-month, randomized, double-masked study comparing latanoprost with timolol in open-angle glaucoma and ocular hypertension. The Latanoprost Study Group. *Ophthalmology.* 1996; 103:126-37.
178. Weinreb RN, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Tsukahara S, Lindsey JD. Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38:2772-80.
179. Weissman SS, Asbell PA. Effects of topical timolol (0,5%) and betaxolol (0,5%) on corneal sensitivity. *Br J Ophthalmol.* 1990; 74:409-14.
180. Wilhelmus KR, Huang AJW, Hwang DG, Parrish CM, Sutphin Jr JE, Whitsett JC. Surgical Procedures of the ocular surface. *In: The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. Basic and Clinical Science Course: External Disease and Cornea.* San Francisco-CA. 2000-2001. 549p: (12):392-408.
181. Williams DE, Nguyen KD, Shapourifar-Tehrani S. Effects of timolol, betaxolol and levobunolol on human Tenon fibroblasts in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992, 33: 2233-40.
182. Wilkerson M, Lewis RA, Shields MB. Follicular conjunctivitis associated with apraclonidine. *Am J Ophthalmol.* 1991, 111:105-11.

183. Woodward DF, Hawley SB, Williams LS, Ralston TR, Protzman CE, Spada CS, Nieves AL. Studies on the ocular pharmacology of prostaglandin D₂. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990; 31(1):138-46.
184. Woodward DF, Krauss AH, Chen J, Lai RK, Spada CS, Burk RM, et al. The pharmacology of bimatoprost (Lumigan). *Surv Ophthalmol*. 2001; 45 Suppl 4:S337-45.
185. Yablonski ME, Shin DH, Kolker AE. Dipivefrin use in patients with intolerance to topically applied epinephrine. *Arch Ophthalmol*. 1977, 95:2157-62.
186. Young TL, Higginbotham EJ, Xiaolian Z, Farber MD. Effects of topical glaucoma drugs on fistulized rabbit conjunctiva. *Ophthalmology*. 1990; 97(11):1423-1427.
187. Zimmerman TJ, Kaufman HE. Timolol: a beta-adrenergic blocking agent for the treatment of glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1977; 95: 601-4.
188. Zimmerman TJ, Dukar U, Nardin GF. Carbachol dose-response. *Am J Ophthalmol*. 1989, 108:456-62.