

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIAS CLÍNICAS

TESE

Influência de Fármacos no Sistema-Renina-Angiotensina do Globo Ocular de Cães
Hígidos: Desenvolvimento Farmacotécnico e Avaliação Clínica.

Eriane de Lima Caminotto

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

**INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS NO SISTEMA-RENINA-
ANGIOTENSINA DO GLOBO OCULAR DE CÃES HÍGIDOS:
DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO
CLÍNICA.**

ERIANE DE LIMA CAMINOTTO

Sob a orientação do Professor Doutor

Luis Carlos Reis

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Outubro de 2015

636.708977

C183i

T

Caminotto, Eriane de Lima, 1983-

Influência de fármacos no sistema-renina-angiotensina do globo ocular de cães hípidos: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação clínica / Eriane de Lima Caminotto. - 2015.

63 f.: il.

Orientador: Luis Carlos Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2015.

Bibliografia: f. 39-45.

1. Cão - Doenças - Tratamento - Teses. 2. Glaucoma - Tratamento - Teses. 3. Farmacologia ocular - Teses. 4. Oftalmologia veterinária - Teses. I. Reis, Luis Carlos, 1952-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ERIANE DE LIMA CAMINOTTO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 21/10/2015



Luis Carlos Reis (Ph. D) UFRRJ
(orientador)



João Antonio Videu Pigatto (Ph. D) UFRGS



Fabricia Viana Fonseca (Ph. D) IFRJ



Wellington da Silva Côrtes (Ph. D) UFRRJ



Jonimar Pereira Paiva (Ph. D) UFRRJ

Agradeço imensamente os mestres João
Telhado Pereira, Luis Carlos Reis e
Wellington da Silva Côrtes pelo apoio
em mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo apoio e confiança durante todos esses anos longe de casa. Obrigada por tudo!

Aos meus animais: Xuxa, Gabriela, Laís, Samy e Polvilho pelo companheirismo e amor incondicional. Obrigada por me mostrarem como é gratificante o convívio diário com os animais.

A todos os cães que participaram deste estudo, pois nada disso aconteceria sem a contribuição de vocês.

À Iracema Araújo, Camila Baruel e Patrícia Souza por toda ajuda da manipulação dos colírios até a execução do experimento propriamente dito. Sem vocês nada disso teria acontecido!

À Larissa Seibt pela rapidez e disponibilidade na ajuda com a formatação da tese.

À Lorena, secretária do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, muito obrigada por toda paciência e ajuda durante essa trajetória.

Aos colegas e estagiários do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Prof. Fabio Scott pelo suporte oferecido sempre que necessário.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, professor Paulo Botteon, pelo auxílio e disponibilidade.

Aos professores Matheus Folgearini da Silveira, Paula Vergara e Carlos Eduardo Nogueira Martins do Instituto Federal Catarinense - Câmpus Araquari por toda força com a estatística dessa pesquisa. Sem vocês eu não teria concluído essa etapa.

RESUMO

CAMINOTTO, Eriane de Lima. **Influência de fármacos no Sistema-Renina-Angiotensina do globo ocular de cães hípidos: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação clínica.** 2015. 52 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O glaucoma é uma das doenças que mais causa cegueira em cães e não possui cura, apenas tratamento. A dificuldade na drenagem do humor aquoso (HA) resulta no aumento da pressão intra-ocular (PIO) que representa um fator de risco significativo para a ocorrência dessa afecção, conduzindo à danos irreversíveis como a perda progressiva do campo visual e da visão como um todo, morte das células ganglionares da retina (CGR), perda de axônios do nervo óptico e escavação do mesmo. Além deste, diversos mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento e progressão desta doença como, por exemplo, os desequilíbrios do sistema-renina-angiotensina (SRA) e as doenças cardiovasculares e renais. A mensuração da PIO e o exame do fundo de olho são os métodos mais utilizados para diagnosticar essa afecção. O tratamento de escolha se baseia em colírios que estimulam a drenagem do HA e/ou diminuem sua produção resultando no controle da PIO; porém em muitos casos a terapia não atinge o efeito desejado e culmina em cegueira. Na tentativa de mudar essa perspectiva terapêutica, o presente trabalho comparou, em cães sadios e normotensos da raça Beagle, a ação sistêmica e ocular de três fármacos: maleato de timolol 0,5% (beta-bloqueador não seletivo usado nos casos de glaucoma), captopril 0,1% e 0,5% (inibidor de ECA1 nunca antes estudado nesta maior concentração em cães) e aceturato de diminazeno – DIZE 0,1% e 0,5% (ativador endógeno de ECA2, nunca antes pesquisado em olhos caninos). Os dois últimos fármacos foram formulados para uso oftalmológico visando a redução da PIO, uma vez que é sabido sobre a existência do SRA a nível ocular e que os mesmos já foram administrados sistemicamente com sucesso na redução pressão arterial sistêmica (PAS). Dessa forma, antes e após os tratamentos, 18 cães foram submetidos ao Teste Lacrimal de Schirmer (TLS1) e à coleta sanguínea para dosagem da concentração da enzima conversora de angiotensina (ECA1) do soro. Durante três dias consecutivos antes dos tratamentos e em três horários distintos (6h, 12h e 18h) todos os animais passaram por quatro exames, seguindo sempre a mesma ordem: avaliação do diâmetro pupilar, aferição da PIO, aferição da FC e da PAS. Após a obtenção dos valores normais, os animais tiveram o olho esquerdo submetido aos protocolos pré-determinados inicialmente com 1 gota, a cada 12 horas, por 7 dias na menor concentração e, nos demais 7 dias, na maior concentração. Os olhos adelfos foram o controle e, todos os dias nos três horários distintos os cães passaram pelos mesmos exames iniciais. Todos os fármacos tiveram boa penetrabilidade e ausência de efeitos adversos a nível ocular. Quanto à produção lacrimal, o captopril é o mais indicado para os pacientes glaucomatosos e portadores de ceratoconjuntivite seca, enquanto que o timolol é contra-indicado para os mesmos. Todos diminuíram os valores da PIO, sendo que na segunda semana de tratamento, com concentrações maiores, as reduções foram mais significativas. A bradicardia foi observada nos animais tratados com captopril 0,5%, com uma redução de quase 9% na FC, quando comparado com o captopril em menor concentração.

Palavras-chave: glaucoma, sistema renina angiotensina, cães.

ABSTRACT

CAMINOTTO, Eriane de Lima. **Drug influence on System-Renin-Angiotensin eyeball dogs: pharmacotechnical development and clinical evaluation.** 52 p. 2015. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Institute of Veterinary, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Glaucoma is a disease that causes more blindness in dogs and has no cure, only treatment. The difficulty in the drainage of aqueous humor (AH) results in an increase in intraocular pressure (IOP), representing a significant risk factor for the occurrence of this condition, leading to irreversible damage to the progressive loss of visual field and vision as a whole death of retinal ganglion cells (RGC), loss of axons in the optic nerve and excavation of the same. In addition to this, several mechanisms may contribute to the development and progression of this disease, for example, unbalances of the renin-angiotensin-system (RAS), and cardiovascular and renal diseases. The measurement of IOP and the examination of the fundus are the methods used to diagnose this condition. The treatment of choice is based on eye drops that stimulate drainage of HA and / or decrease their production resulting in IOP control; however in many cases the treatment does not attain the desired effect, culminating in blindness. In an attempt to change this therapeutic perspective, this study compared, in healthy and normotensive Beagle dogs, systemic and ocular action of three drugs: timolol maleate 0.5% (non-selective beta-blocker used in cases of glaucoma) , captopril 0.1% and 0.5% (ECA1 inhibitor never before studied in greater concentration in dogs) and aceturato of diminazene - DIZE 0.1% and 0.5% (endogenous activator of ACE2, never before researched in eyes canines). The latter two drugs were formulated for ophthalmic use for the reduction of IOP, since it is known about the existence of SARS eye level, and that they have been successfully administered systemically at reducing systemic arterial pressure (SAP). Thus, before and after treatment, 18 dogs underwent the Schirmer Tear Test (TLS1) and blood collection for measuring the concentration of angiotensin-converting enzyme (ECA1) serum. For three consecutive days before treatment and at three times (6h, 12h and 18h) all animals have gone through four exams, always following the same order: evaluation of pupil size, IOP measurement, measurement of HR and SAP. After obtaining the normal range, the animals had the left eye subjected to predetermined protocols initially with 1 drop every 12 hours, 7 days a lower concentration and, in the other seven days, in the highest concentration. The adelfos eyes were control and every day in the three different times dogs went through the same initial exams. All drugs were good penetration and no adverse eye level. As for tear production, captopril is the most suitable for glaucoma patients and patients with keratoconjunctivitis sicca, while timolol is contraindicated for them. All decreased IOP values, and in the second week of treatment, with higher concentrations, reductions were more significant. The bradycardia was observed in captopril-treated animals 0.5%, with a reduction of almost 9% in HR compared to captopril in lower concentrations.

Keywords: glaucoma, system renin-angiotensin-aldosterone, dogs.

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1: sinais clínicos do glaucoma..... | 08 |
| Quadro 2: médias das concentrações de ECA obtidas nos dias 0 e 18 dos grupos tratados respectivamente com timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC)..... | 24 |
| Quadro 3: médias e desvio-padrão dos valores de TLS1 obtidos nos dias 0 e 18 dos olhos direitos usados como controle para os respectivos grupos: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC). | 25 |
| Quadro 4: médias e desvio-padrão dos valores de TLS1 obtidos nos dias 0 e 18 dos olhos esquerdos dos grupos de cães tratados respectivamente com: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC)..... | 26 |
| Quadro 5: médias e desvio-padrão dos valores de FC obtidos entre os intervalos de dias: 1-3 dias (controle), 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados respectivamente com: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC). | 28 |
| Quadro 6: médias e desvio-padrão dos valores de PAS obtidos entre os intervalos de dias: 1-3 dias (controle), 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados respectivamente com: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC). | 30 |
| Quadro 7: médias e desvio-padrão dos valores de PIO obtidos dos olhos direitos e esquerdos entre os intervalos de 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados com timolol 0,5% (GA), seguido da diferença significativa da PIO entre OD e OE ($p<0,05$) e das percentagens de repetição desses dados (r^2). | 33 |
| Quadro 8: médias e desvio-padrão dos valores de PIO obtidos dos olhos direitos e esquerdos entre os intervalos de 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados com captopril 0,1% e 0,5% respectivamente (GB), seguido da diferença significativa da PIO entre OD e OE ($p<0,05$) e das percentagens de repetição desses dados (r^2). | 33 |
| Quadro 9: médias e desvio-padrão dos valores de PIO obtidos dos olhos direitos e esquerdos entre os intervalos de 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados com DIZE 0,1% e 0,5% respectivamente (GC), seguido da diferença significativa da PIO entre OD e OE ($p<0,05$) e das percentagens de repetição desses dados (r^2). | 34 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1: anatomia do globo ocular..... | 3 |
| Figura 2: drenagem convencional do humor aquoso, com o humor aquoso, produzido na câmara posterior, atravessando a pupila e sendo drenado pelo ângulo iridocorneano para as veias extra-oculares (adaptado de QUIROZ, 2007). | 5 |
| Figura 3: drenagem não-convencional do humor aquoso através da rota uveoescleral (adaptado de QUIROZ, 2007). | 5 |
| Figura 4: representação da cascata enzimática do sistema renina-angiotensina com o angiotensinogênio, a partir da renina, sendo transformado em angiotensina I que, por sua vez, é convertida em angiotensina II através da ação da ECA, que é uma enzima também responsável pela degradação da bradicinina em fragmentos inativos..... | 11 |
| Figura 5: representação da cascata enzimática do sistema renina-angiotensina com o angiotensinogênio, a partir da renina, sendo transformado em angiotensina I que por sua vez é convertida através de ECA em angiotensina II que pode se ligar aos receptores AT1 e AT2. ECA2 pode degradar angiotensina I e angiotensina II em angiotensinas (1-9) e (1-7) respectivamente. Angiotensina (1-9) é degradada em (1-7) pela ECA. Enzimas Endopeptidase neutra (NEP) e Prolil endopeptidase (PEP) degradam angiotensina I em (1-7) que pode agir nos receptores AT2 ou Mas..... | 13 |
| Figura 6: Aferição da pressão intra-ocular de um cão da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2015. | 19 |
| Figura 7: Teste Lacrimal de Schirmer em um cão da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2015. | 21 |
| Figura 8: instilação do colírio DIZE 0,5% em um cão da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2015..... | 21 |
| Figura 9: diagrama representando o protocolo experimental usado neste estudo: (A) protocolo tópico com timolol 0,5%, 2 vezes ao dia, durante 14 dias; (B) protocolo tópico com captopril 0,1%, 2 vezes ao dia, por 7 dias e 0,5%, 2 vezes ao dia por outros 7 dias, e (C) protocolo tópico com DIZE 0,1%, 2 vezes ao dia por 7 dias e 0,5%, 2 vezes ao dia por outros 7 dias. Em todos os grupos, nos dias 0 a 18 foi realizado o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) e coletado sangue para dosagem da enzima conversora de angiotensina (ECA). As pupilas, pressão intraocular (PIO), frequência cardíaca (FC) e pressão arterial sistêmica (PAS) foram avaliadas 3 dias antes de iniciar o protocolo experimental e durante os 14 dias de experimento sempre nos horários de 6hs, 12hs e 18hs. | 22 |
| Figura 10: médias dos valores de ECA1 obtidos nos dias 0 e 18 dos cães dos grupos captopril e DIZE. | 25 |
| Figura 11: médias dos valores do TLS1 dos olhos direitos (D) e esquerdos (E) dos cães do grupo do timolol (TIM) obtidos no dia 0 e 18..... | 26 |
| Figura 12: médias dos valores do TLS1 dos olhos direitos e esquerdos dos cães do grupo do captopril, obtidos no dia 0 e 18..... | 277 |
| Figura 13: médias dos valores do TLS1 dos olhos direitos e esquerdos dos cães do grupo do DIZE, obtidos no dia 0 e 18..... | 288 |
| Figura 14: médias dos valores de FC dos cães dos grupos timolol, captopril e DIZE, respectivamente; obtidos nos dias 1-3 (controle), 4-10 (tratamento com menor concentração das drogas) e 11-17 (tratamento com alta concentração das drogas). | 29 |

| | |
|--|----|
| Figura 15: médias dos valores de PAS dos cães dos grupos timolol, captopril e DIZE, respectivamente; obtidos nos dias 1-3 (controle), 4-10 (tratamento com menor concentração das drogas) e 11-17 (tratamento com alta concentração das drogas). | 31 |
| Figura 16: médias dos valores de PIO dos olhos esquerdos tratados com timolol (GA), captopril (GB) e DIZE (GC) e dos olhos adelfos usados como controle (CTRL); obtidos durante o experimento com baixa dose (4-10 dias) e alta dose (11-17 dias) nos diferentes horários (6hs, 12hs e 18hs). | 32 |
| Figura 17: médias dos valores representados de diâmetro pupilar (-1=miose, 0=normal, +1=midríase) dos olhos tratados com timolol, captopril e DIZE, nos dias 0 e 18, mostrando os valores máximos e mínimos obtidos. | 36 |

LISTA DE ABREVIACOES

| | |
|--------------|--|
| A-779 | Antagonista do Receptor Mas |
| Ang (1-7) | Angiotensina (1-7) |
| Ang (1-9) | Angiotensina (1-9) |
| AT1 | Receptos AT1 |
| AT2 | Receptor AT2 |
| BAB | Barreira Hemato-Aquosa |
| BRB | Barreira Hemato-Retiniana |
| DIZE | Aceturato de Diminazeno |
| ECA1 | Enzima Conversora de Angiotensina 1 |
| ECA2 | Enzima Conversora de Angiotensina 2 |
| FC | Frequência Cardíaca |
| IV | Instituto de Veterinária |
| LQEPV | Laboratório de Quimioterapia Experimental de Parasitologia Veterinária |
| μ l/min. | Microlitro por minuto |
| mmHg | Milímetro de Mercúrio |
| mm/min. | Milímetro por minuto |
| NO | xido Nítrico |
| PAS | Pressão Arterial Sistêmica |
| PIO | Pressão intra-ocular |
| RGCs | Células ganglionares da retina |
| SRA | Sistema Renina Angiotensina |
| SRAA | Sistema Renina Angiotensina Aldosterona |
| TLS | Teste lacrimal de Schirmer I |
| TECSA | Tecnologia em Sanidade Animal |
| UFRRJ | Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro |

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | I |
| 2 | OBJETIVOS | 2 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 3.1 | Anatomia e Fisiologia do Globo Ocular | 3 |
| 3.2 | Conceito do Glaucoma | 6 |
| 3.3 | Classificação do Glaucoma | 6 |
| 3.4 | Sinais Clínicos do Glaucoma | 7 |
| 3.5 | Diagnóstico de Glaucoma | 9 |
| 3.6 | Terapias para o Glaucoma | 9 |
| 3.7 | Componentes do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) | 11 |
| 3.8 | Sistema Renina-Angiotensina (SRA) e o Globo Ocular | 14 |
| 3.9 | Novas Descobertas Sobre o SRA no Globo Ocular | 15 |
| 3.10 | Manipulação de Colírios | 16 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 | Princípios Éticos na Experimentação Animal | 18 |
| 4.2 | Grupo de Animais | 18 |
| 4.3 | Manipulação dos Colírios | 18 |
| 4.4 | Tonometria | 19 |
| 4.5 | Mensuração da Frequência Cardíaca (FC) | 20 |
| 4.6 | Mensuração da Pressão Arterial Sistêmica (PAS) | 20 |
| 4.7 | Protocolo Experimental | 20 |
| 4.8 | Análise Estatística | 23 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 5.1 | Sinais Clínicos | 24 |
| 5.2 | Avaliação da ECA1 | 24 |
| 5.3 | Avaliação do TLS1 | 25 |
| 5.4 | Avaliação da FC | 28 |
| 5.5 | Avaliação da PAS | 30 |
| 5.6 | Avaliação da PIO | 31 |
| 5.7 | Avaliação do Diâmetro Pupilar | 35 |
| 6 | CONCLUSÕES | 37 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 38 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| 9 | ANEXOS | 46 |
| | ANEXO A | 47 |
| | ANEXO B | 48 |
| | ANEXO C | 49 |
| | ANEXO D | 50 |
| | ANEXO E | 51 |
| | ANEXO F | 52 |

1 INTRODUÇÃO

O glaucoma é uma síndrome que cursa com diversas neuropatias ópticas que têm em comum a morte progressiva de células ganglionares da retina (RGCs), o dano do nervo óptico e o aumento da pressão intra-ocular (PIO), resultando em perda de visão. A PIO elevada é considerada o fator de risco mais importante relacionado com o glaucoma (GELATT & BROOKS, 1999; ABRAMS, 2001; WHITEMAN et al., 2002), mas diversos mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento e progressão desta doença como, por exemplo, os desequilíbrios do sistema renina angiotensina (SRA), as doenças cardiovasculares e renais.

Classicamente, o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é formado por uma cascata hormonal, em que a renina cliva o angiotensinogênio para produzir angiotensina (Ang) I. Posteriormente, a enzima conversora de angiotensina (ECA1) age de duas formas: converte esse peptídeo em Ang II e degrada a bradicinina em fragmentos inativos. Ang II, quando atua em receptores AT1, é um potente vasoconstritor, modulador de crescimento e peptídeo pró-inflamatório. A bradicinina é um vasodilatador poderoso e permeabilizador da parede dos vasos devido em parte à produção de prostaglandinas e óxido nítrico (NO) que desencadeia. Dessa forma, para obtermos a redução da pressão sistêmica ou intra-ocular devemos reduzir a ação da Ang II (vasoconstritor) e aumentar os níveis de bradicinina (vasodilatador); sendo o inibidor de ECA1 uma chave importante nesse processo uma vez que a ECA1 e os demais componentes do SRA também estão presentes nos tecidos e fluidos oculares.

Ampliando o conceito do SRAA, nas últimas décadas, novos componentes biologicamente ativos foram descobertos. Neste contexto, a identificação da ECA2, Ang (1-7) e receptor Mas compôs um eixo capaz de provocar ações benéficas que se opõem aos vários efeitos deletérios induzidos pela Ang II. A ECA2 degrada Ang II para gerar Ang (1-7) e, portanto, ela pode ser um alvo terapêutico promissor na redução da pressão sistêmica e intra-ocular; assim como os inibidores de ECA1.

A expressão de ECA2 foi detectada em ambos os corpos ciliares e retinas de porcos. Além de ECA2, Ang (1-7) e receptor Mas também foram observados nos olhos de coelhos e ratos, o que indica que o eixo ECA2 / Ang (1-7) / Mas do SRA também está presente nos tecidos oculares.

Portanto, todos esses conceitos motivaram a pesquisa e a comparação, em cães saudáveis e normotensos, da ação sistêmica e ocular de três fármacos em diferentes concentrações: maleato de timolol 0,5% (beta-bloqueador não seletivo rotineiramente usado nos casos de glaucoma), captopril 0,1% e 0,5% (inibidor de ECA1 nunca antes estudado nesta maior concentração) e acetato de diminazeno – DIZE 0,1% e 0,5% (ativador endógeno de ECA2, nunca antes pesquisado em olhos caninos), sendo os dois últimos manipulados na forma de colírio no laboratório de ciências farmacêuticas da UFRRJ, pois não existem comercialmente.

2 OBJETIVOS

Considerando as limitações do tratamento do glaucoma e os poucos estudos sobre o eixo SRA ocular em cães, o objetivo principal do presente trabalho foi a avaliação clínico-oftalmológica de pacientes hípidos sobre a influência de novos fármacos que atuam no SRA do globo ocular.

Os objetivos secundários do presente trabalho foram:

- 1- Manipular novos fármacos para obtenção de colírios com uma boa penetrabilidade a nível ocular e sem efeitos colaterais;
- 2- Avaliar uma possível interferência desses novos fármacos na produção lacrimal e no diâmetro pupilar;
- 3- Avaliar e comparar os efeitos oculares, principalmente sobre a PIO, proporcionados por cada um dos fármacos, nas diferentes concentrações, sobre o eixo SRA ocular;
- 4- Avaliar e comparar os efeitos sistêmicos sobre a pressão arterial sistêmica (PAS) e frequência cardíaca (FC) proporcionados por cada um dos fármacos nas diferentes concentrações.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia e Fisiologia do Globo Ocular

O globo ocular é composto por três túnicas: fibrosa, vascular e nervosa. A túnica fibrosa confere a forma e proteção do globo, sendo composta pela córnea e esclera. A túnica vascular (responsável pela irrigação sanguínea), denominada trato uveal ou úvea, está situada profundamente à esclera, na qual se fixa, sendo composta pela íris, corpo ciliar e coróide. A túnica nervosa é composta pela retina e nervo óptico, sendo considerada um prolongamento do encéfalo inserido no nervo óptico (DYCE, 2004) (Figura 1).

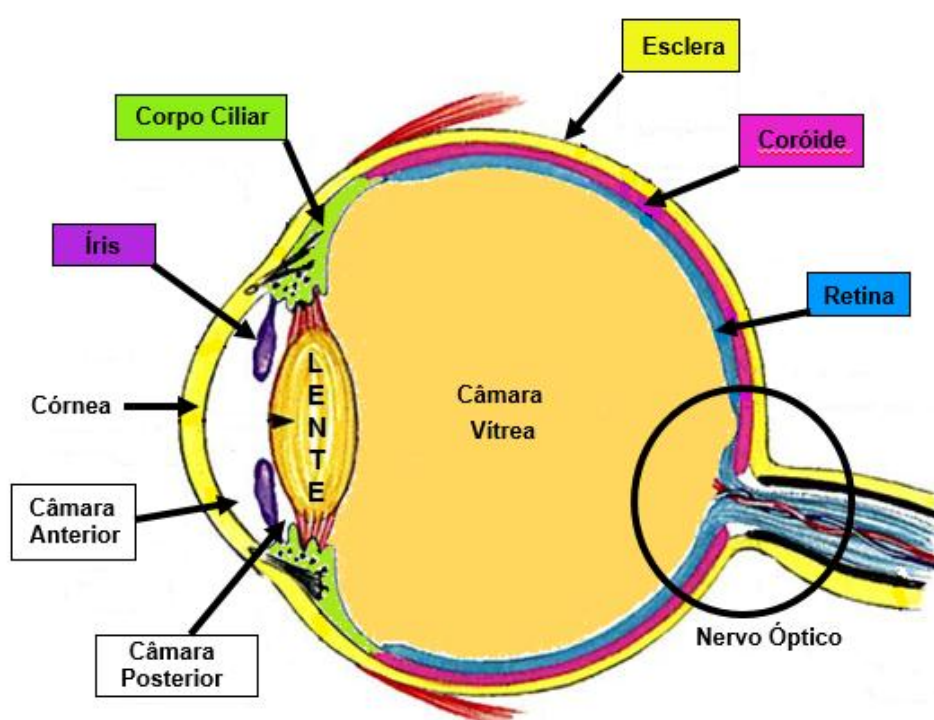


Figura 1: anatomia do globo ocular.

A córnea é uma potente superfície de refração óptica, transparente e curva. Sua transparência se deve à ausência de vasos sanguíneos, à ausência de pigmentos, à superfície óptica lisa conferida pelo filme lacrimal, ao controle do conteúdo do humor aquoso e à disposição regular e organizada das fibras colágenas. Edema corneano, perda de alguma camada corneana, alteração do filme lacrimal pré-corneano e aumento da PIO são fatores que alteram a disposição regular do colágeno, reduzindo a transparência da córnea (SLATTER, 2005).

A esclera é a maior porção da túnica fibrosa do olho (SLATTER, 2005), composta por uma densa rede de fibras colágenas e elásticas, geralmente de cor branca. Tem como função conferir fixação aos músculos oculares e, posteriormente é recoberta por uma membrana delgada que a separa da gordura retrobulbar, criando uma concavidade onde o bulbo pode se movimentar (DYCE, 2004).

A íris controla a entrada de luz que penetra através da pupila e atinge a retina. Esse controle do diâmetro pupilar ocorre em função dos músculos dilatadores e constritores da pupila. A íris na espécie canina é extremamente vascularizada possuindo a artéria ciliar que circunda total ou quase que totalmente a mesma (SLATTER, 2005); exigindo atenção nos procedimentos cirúrgicos que envolvem essa estrutura.

O corpo ciliar se localiza posteriormente à íris (SLATTER, 2005) representado como um anel em relevo com uma parte pregueada (*pars plicata*) seguida de uma área plana (*pars plana*) que se liga à retina. Na região da *pars plana* existem as fibras zonulares que se convergem em direção à lente, conferindo sustentação à mesma. Entre o corpo ciliar e a esclera está o músculo ciliar liso que vai atuar na acomodação da lente, ou seja, na capacidade do olho em focalizar objetos próximos ou distantes (DYCE, 2004).

A coróide se localiza entre a retina e a esclera, sendo composta por uma densa rede de vasos sanguíneos (SLATTER, 2005). Na porção dorsal do fundo, a coróide forma uma área de reflexão de luz, de coloração variada (*tapete lúcido*) que acredita-se ser uma adaptação noturna (DYCE, 2004).

A retina é composta por várias camadas celulares: uma camada de células pigmentadas, uma camada neuroepitelial, uma camada com as células fotossensíveis (cones e bastonetes), uma camada de células ganglionares bipolares e outra multipolares, onde os axônios amielínicos, de localização interna às células, passam para o disco óptico e se agregam para formar o nervo óptico (DYCE, 2004).

A consistência do globo ocular decorre da presença do humor aquoso e do humor vítreo. O primeiro consiste numa solução mais liquefeita que circula livremente pelas câmaras anterior e posterior (DYCE, 2004). O segundo consiste numa massa gelatinosa, transparente, que ocupa cerca de 80% do volume do olho e que se encontra na câmara vítrea; sendo composto por água (99%), fibras colágenas, hialócitos e ácido hialurônico (SLATTER, 2005).

O humor aquoso é produzido como uma secreção ativa do epitélio que começa com o transporte ativo de íons sódio (favorecido pela anidrase carbônica) nos espaços entre as células epiteliais. Em seguida, íons cloretos e bicarbonato são arrastados para esses espaços na tentativa de manter a neutralidade elétrica. A junção destes íons causam a osmose de água do tecido subjacente para os mesmos espaços. Além disso, através de transporte ativo ou difusão facilitada, substâncias lipofílicas, como glicose, ácido ascórbico e aminoácidos, são transportadas da membrana celular (GYTON, 2001).

A produção e drenagem do humor aquoso é de forma contínua e o equilíbrio dessa equação é o responsável pela regulação do volume e da pressão intra-ocular. No cão a produção do humor aquoso é de 2,5 microlitros / minuto, nos gatos 1,5 microlitros / minuto e no homem de 2 a 2,5 microlitros / minuto (QUIROZ, 2007).

A produção do humor aquoso pode ser afetada por variações circadianas, pela contração dos músculos extra-oculares, inflamação intra-ocular, alterações das pressões osmóticas e sanguíneas e por drogas tópicas e sistêmicas, entre outros fatores (SLATTER, 2005). Entretanto, demais alterações do organismo só modificarão a produção do humor aquoso, se a barreira hemato-aquosa for rompida (HAKANSON & FORRESTER, 1990).

As barreiras existentes nos olhos são importantes assim como a barreira hemato-encefálica. Quando essas barreiras são rompidas, o olho ou o cérebro sofrerão ação de substâncias presentes na circulação sistêmica. Duas barreiras hemato-oculares são clinicamente significativas: a barreira hemato-retina (BRB) e a barreira hemato-aquosa (BAB). A BRB compreende dois grandes componentes: o endotélio dos vasos sanguíneos da retina (barreira) e o interior epitélio da retina pigmento (barreira externa). A BAB, muito

importante nos casos de glaucoma, é formada por uma barreira epitelial localizada na camada não pigmentada do epitélio ciliar e no epitélio irídico posterior, e pelo endotélio dos vasos irídicos (CUNHA-VAZ, 2004).

Seguindo a formação normal do humor aquoso e sem a ruptura da BAB, a drenagem do mesmo pode ser de duas maneiras: convencional envolvendo o ângulo iridocorneano e, não convencional (correspondente a 15% em cães e 3% em gatos), através da esclera e do sistema linfático orbital (SLATTER, 2005).

Na drenagem convencional, depois de formado na câmara posterior, o humor aquoso flui através dos processos ciliares (GYTON, 2001), entre as fibras zonulares e, em seguida, atravessa a pupila para a câmara anterior do olho e é drenado pelo ângulo iridocorneano, desembocando nas veias extra-oculares (Figura 2).

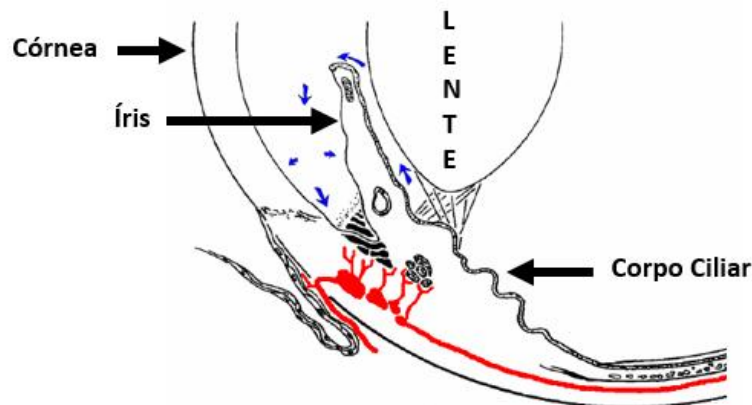


Figura 2: drenagem convencional do humor aquoso produzido na câmara posterior, atravessando a pupila e sendo drenado pelo ângulo iridocorneano para as veias extra-oculares (adaptado de QUIROZ, 2007).

Na drenagem não convencional, vários canais vasculares drenam o humor aquoso das trabéculas corneoesclerais (ligamento cribiforme) para as veias de maior calibre e, posteriormente, para um plexo venoso escleral na esclerótida média (SLATTER, 2005).

A drenagem do humor aquoso em cães também é realizada através da rota uveoscleral, onde o fluxo do humor aquoso ocorre através do ângulo no interstício do músculo ciliar, onde o humor aquoso é reabsorvido, provavelmente pelos vasos da coróide e pelos linfáticos da órbita (SLATTER, 2005) (Figura 3).

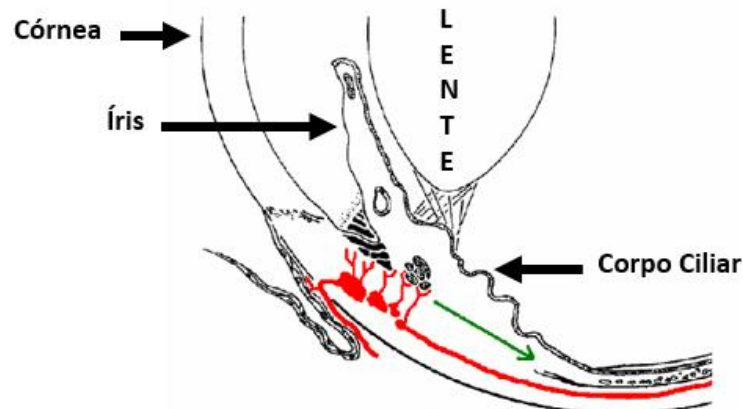


Figura 3: drenagem não-convencional do humor aquoso através da rota uveoscleral (adaptado de QUIROZ, 2007).

3.2 Conceito do Glaucoma

Existem muitas teorias com relação à patogênese do glaucoma, mas o mecanismo preciso ainda é desconhecido (VAJANEN, 2009). Para a população em geral o conceito de glaucoma é definido como “o aumento da pressão intra-ocular (PIO), com perda da visão”. Porém, com o avanço da Medicina Humana, observou-se que muitos pacientes glaucomatosos apresentavam perdas visuais, mas a PIO permanecia dentro da normalidade. Com a evolução da doença, a PIO aumenta e contribui com maiores danos nas vias neuronais, citotóxicas e vasculares, levando o paciente à cegueira (WHITEMAN et al., 2002; MARTINS et al., 2006).

Atualmente, a definição mais aceita para o termo glaucoma seria uma síndrome que cursa com diversas enfermidades oftalmológicas associadas ao aumento da PIO. Essas enfermidades seriam: perda progressiva do campo visual e da visão como um todo, morte das células ganglionares da retina (CGR), perda de axônios do nervo óptico e escavação do nervo óptico (BROOKS et al., 1997; GELATT & BROOKS, 1999; ABRAMS, 2001; WHITEMAN et al., 2002; MARTINS et al., 2006).

Embora a PIO elevada seja o maior fator de risco conhecido para o glaucoma; a alteração do fluxo sanguíneo ocular também está associada ao mesmo. Flutuações do fluxo sanguíneo ocular são mais prejudiciais na neuropatia óptica glaucomatosa do que uma redução constante do mesmo (TIELSCH et al., 1995). Além disso, flutuações na pressão arterial sistêmica (hipotensão noturna episódica) pode aumentar a susceptibilidade do cabeça do nervo óptico ao dano (MITCHELL et al., 2004; VAAJANEN, 2009).

O glaucoma está associado com o aumento da pressão intra-ocular, mas esta não é o fator desencadeador da síndrome e sim, um agente que contribui e acelera a neuropatia óptica glaucomatosa. Antes de fechar um diagnóstico de glaucoma em pacientes com PIO elevada, é essencial que a cabeça do nervo óptico seja avaliada e constatada a escavação ou anomalias no campo visual; pois se a PIO elevada não cursar com esses sinais clínicos, o diagnóstico será de hipertensão ocular (KWON & CAPRIOLI, 2006).

Na Medicina Veterinária os valores de PIO entre 15 e 30 mmHg são considerados normais para cães e gatos (GELATT & BROOKS, 1999), mas vale ressaltar que esse intervalo pode ser um pouco diferente conforme a raça em questão. Diferente da Medicina Humana, a maioria dos animais já chegam nos consultórios com a PIO elevada, pois como eles dependem dos seus donos, os mesmos só visualizam um possível problema oftalmológico, quando os olhos já sofrem com danos extensos decorrentes da elevação da PIO, como é o caso da buftalmia, edema corneano e congestão episcleral (GIONFRIDDO, 1995; MARTINS et al., 2006).

3.3 Classificação do Glaucoma

O glaucoma canino pode ser classificado por diversos métodos, sendo mais utilizada a classificação quanto à sua causa que se refere ao glaucoma primário, secundário ou congênito (GELATT & BROOKS, 1999).

No glaucoma primário, a obstrução do ângulo iridocorneano faz com que o humor aquoso não consiga ser drenado gerando acúmulo do mesmo no interior do globo ocular, sem haver outras afecções intra-oculares pré-existentes. Esse tipo de glaucoma pode ser dividido

em primário de ângulo aberto ou fechado, sendo este diagnóstico realizado através do exame de gonioscopia (GELATT & BROOKS, 1999; MARTINS et al., 2006), o qual avalia com o auxílio de uma lente específica, a real situação anatômica do ângulo iridocorneano. É comum que esse tipo de glaucoma acometa o olho adelfo não afetado em até dois anos após o diagnóstico do primeiro olho glaucomatoso. Dentre as raças predispostas a este tipo de glaucoma estão o Basset Hound, Beagle, Cocker Spaniel e Poodle, dentre outras (WILKIE, 1998; MARTINS et al., 2006).

O glaucoma secundário ocorre normalmente de forma unilateral e não-hereditária (SLATTER, 2005). Embora não seja considerado hereditário, algumas das causas que incitam sua ocorrência têm uma base genética (por exemplo, catarata e luxação do cristalino). Os cães de raças predispostas a estas condições que tenham desenvolvido uma elevação da PIO de um olho deve ter o olho contralateral rotineiramente monitorado quanto ao desenvolvimento dessa afecção. Além disso, após uma cirurgia de catarata, o glaucoma pós-operatório é uma complicação potencial (REINSTEIN et al., 2009), pois, assim como ocorre após o surgimento de uma outra doença intra-ocular que provoca de alguma forma a obstrução da drenagem do ângulo iridocorneano, as proteínas do cristalino ou as células inflamatórias presentes após a cirurgia de catarata também podem obstruir o ângulo de drenagem ocasionando o glaucoma. Dentre as doenças primárias mais comuns estão as luxações ou subluxações da lente, cataratas, uveítes, neoplasias intra-oculares, traumas ou complicações pós-operatórias (GELATT & BROOKS, 1999).

O glaucoma congênito, embora raro nos animais domésticos, pode estar presente ao nascimento ou logo após o mesmo (SLATTER, 2005). Alteração nas vias de drenagem faz com que o humor aquoso se acumule e, conseqüentemente, a PIO se eleva desencadeando toda a síndrome glaucomatosa. A doença pode ser unilateral ou bilateral e pode estar associada com outros anomalias (REINSTEIN et al., 2009). Dentre as raças mais comuns a apresentarem essa afecção estão o Basset Hound, Chihuahua, Bouvier dês Flandres, Schnauzer Gigante, Cocker Spaniel e Samoiada (GELATT & BROOKS, 1999; MARTINS et al., 2006).

3.4 Sinais Clínicos do Glaucoma

Na Medicina Veterinária os proprietários muitas vezes só percebem a alteração ocular após a elevação da PIO, sendo que os sinais mais comuns observados nos pacientes glaucomatosos num primeiro atendimento são: buftalmia, congestão dos vasos episclerais, hiperemia conjuntival e o desconforto apresentado pelos animais através do blefaroespasma e prurido local (SLATTER, 1990; GIONFRIDDO, 1995, MARTINS et al., 2006).

Com o aumento do globo ocular (buftalmia) nos casos de glaucoma, há alteração no endotélio corneano gerando o edema de córnea (JEGOU, 1989). Em casos mais severos pode haver a ruptura da membrana de Descemet causando o aparecimento das estrias de Haab que contribuem com a dificuldade visual, pois o humor aquoso penetra por entre as células do estroma corneano gerando opacidade nessa região (GELATT & BROOKS, 1999).

A buftalmia expõe o globo ocular ao meio externo gerando um ressecamento da córnea, seguido de neovascularizações, pigmentações e, conseqüentemente, uma tendência maior às ulcerações e perfurações. Contudo, a esclera também é exposta de forma irreversível,

tornando-se delgada e repleta de vasos calibrosos (GELATT & BROOKS, 1999; MARTINS et al., 2006).

A buftalmia provoca um aumento na tensão sobre os ligamentos zonulares que sustentam a lente e, portanto, a mesma pode luxar ou subluxar. O deslocamento da lente pode ainda culminar no bloqueio pupilar, iridociclite e edema corneano quando a mesma entrar em contato com o endotélio corneano (SLATTER, 1990; MARTINS et al., 2006).

O aumento da PIO causa deficiência no suprimento sanguíneo e nervoso da íris que juntamente com a disfunção das células ganglionares da retina culminam com a dilatação da pupila. A midríase está presente na maioria dos casos de glaucoma juntamente com a ausência dos reflexos diretos e consensuais à luz (SLATTER, 2005).

A acuidade visual é perdida precocemente quando a elevação da PIO é grande o suficiente para que haja a interrupção do fluxo axoplasmático nos axônios das células ganglionares da retina, causando isquemia, degeneração e atrofia irreversível (NASKAR & DREYER, 2001; MARTINS et al., 2006).

Os sinais clínicos variam de acordo com a evolução do quadro (Quadro 1). Nos casos de glaucoma crônico, a escavação do nervo óptico, vista oftalmoscopicamente, indica dano irreversível a cabeça do nervo (SLATTER, 2005). Além disso, é observada atrofia de retina com hiperreflexia da área tapetal, atenuação dos vasos retinianos e atrofia do epitélio pigmentar da área não-tapetal (SLATTER, 1990, MARTINS et al., 2006). No glaucoma agudo, os meios oculares raramente são transparentes o suficiente para que as estruturas internas possam ser observadas e a PIO elevada somada aos demais sinais clínicos em córnea e esclera são característicos para o diagnóstico do glaucoma (SLATTER, 2005).

Quadro 1: sinais clínicos do glaucoma (adaptado de SLATTER, 2005)

| Glaucoma Agudo | Glaucoma Subagudo | Glaucoma Crônico |
|-----------------------------------|--------------------------------|--|
| Dor | Dor | Dor (variável) |
| Edema corneano | Edema corneano | Vascularização e pigmentação corneana |
| Blefaroespasm | Blefaroespasm | Ausência de afácico crescente corneano |
| Catarata | Cegueira | Catarata |
| Anorexia | Anorexia | Anorexia |
| Depressão | Depressão | Depressão, timidez ou agressividade |
| Pupila fixamente dilatada | Pupila fixamente dilatada | Pupila fixamente dilatada |
| Congestão episcleral | Congestão episcleral | Congestão episcleral |
| PIO aumentada | PIO aumentada | PIO aumentada (variável) |
| Câmara anterior rasa (se visível) | Câmara anterior rasa | Câmara anterior rasa |
| Redução da acuidade visual | Redução da acuidade visual | Redução da acuidade visual |
| Luxação da lente (variável) | Luxação da lente (variável) | Luxação da lente (variável) |
| Reflexo pupilar direto abolido | Reflexo pupilar direto abolido | Reflexo pupilar direto abolido |
| | Estrias de Descemet (variável) | Estrias de Descemet (variável) |
| | | Atrofia de íris |
| | | Atrofia retiniana e óptica |

3.5 Diagnóstico de Glaucoma

O diagnóstico do glaucoma é baseado na avaliação dos sinais clínicos seguido dos exames de tonometria e oftalmoscopia de ambos os olhos, independente do problema ser uni ou bilateral (GELATT & BROOKS, 1999).

A tonometria permite mensurar a pressão intra-ocular através de um aparelho chamado Tonopen (TonoPen XL, Medtronic) que é um tonômetro de aplanção de fácil manipulação que permite aferição da PIO com a cabeça do animal em qualquer posição, gerando o resultado em mmHg em um leitor de cristal líquido após o mesmo ser encostado numa pequena área da córnea (ABRAMS, 2001; MARTINS et al., 2006).

Através da oftalmoscopia direta ou indireta, as estruturas do fundo do olho são avaliadas quanto à presença de hiperreflexia da área tapetal, atenuação dos vasos retinianos e escavação do nervo óptico. É de suma importância que as estruturas anteriores ao fundo do olho (córnea e lente) estejam livres de opacidades para que a retina e nervo óptico possam ser visualizados e avaliados (GELATT & BROOKS, 1999; ABRAMS, 2001; MARTINS et al., 2006).

Outros exames de extrema valia para o diagnóstico do glaucoma são a ultrassonografia, a gonioscopia e a eletrorretinografia (GELATT & BROOKS, 1999).

A ultrassonografia com Doppler colorido é um exame não-invasivo, que permite avaliar o fluxo sanguíneo, a resistência vascular das artérias oftálmicas e a escavação precoce do nervo óptico, especialmente quando os olhos apresentam opacificação de meios transparentes como a córnea e a lente (CHIOU et al., 1999; TAMBURRELLI et al., 2000; MARTINS et al., 2006)

A gonioscopia permite examinar o ângulo iridocorneano e, assim, contribuir para a determinação do tipo de glaucoma (ângulo aberto ou fechado) e para a seleção da melhor terapia para cada caso. Após a insensibilização da córnea com colírios anestésicos, o exame é iniciado com a leve pressão de uma lente própria para gonioscopia ou simplesmente com uma lente manual de + 20 D ou + 30 D sobre a córnea. Através dessa lente é possível observar o ângulo de drenagem do humor aquoso desde que haja transparência dos meios que antecedem o mesmo (GELATT & BROOKS, 1999; WOOD et al., 2001; MARTINS et al., 2006).

A eletrorretinografia é menos utilizada no diagnóstico de glaucoma na Medicina Veterinária, devido ao custo da técnica e à necessidade de sedação do animal. Esse exame avalia a resposta das células retinianas a um estímulo luminoso e, no caso dos pacientes glaucomatosos, ele revela uma diminuição dessa resposta decorrente da lesão das células ganglionares da retina proporcionando, assim, um diagnóstico precoce do glaucoma (ORIÁ, 2004; MARTINS et al., 2006).

3.6 Terapias para o Glaucoma

A patogênese do glaucoma e o estado do ângulo iridocorneano são fatores importantes para a escolha correta do tratamento. Além disso, após o diagnóstico, na maioria das vezes o olho remanescente deve ser tratado profilaticamente e a PIO deve ser aferida regularmente (SLATTER, 2005).

No glaucoma agudo, a redução precoce da PIO é primordial para prevenir danos irreversíveis à visão. Nesses casos, o tratamento de escolha e emergencial se baseia na administração do manitol solução a 20% por via intravenosa, na dose de 1 a 1,5 g/Kg, durante 15 a 20 minutos (GELATT & BROOKS, 1999; SLATTER, 2005). Como a redução da PIO é rápida, porém temporária, é indicado iniciar o tratamento definitivo o quanto antes.

Como tratamentos cirúrgicos existem as técnicas que visam a redução da formação do humor aquoso através da destruição de algumas regiões do corpo ciliar como é o caso da ciclocrioterapia (destruição pelo frio) e da ciclofotocoagulação a laser (destruição pelo uso dos lasers neodímio: ítrio-alumínio-garnet (Nd: YAG) e o diodo); porém ambas as técnicas apresentam grande taxa de insucesso e de reações adversas como quemose e uveíte (SLATTER, 2005). Outra técnica cirúrgica utilizada visa aumentar a drenagem do humor aquoso através colocação dos gonioimplantes, porém a mesma apresenta alto índice de recidiva do glaucoma decorrente da obstrução do espaço de drenagem pelo processo cicatricial formado no local (GIONFRIDDO, 1995).

Embora a variedade de técnicas cirúrgicas esteja aumentando, o tratamento de escolha para as síndromes glaucomatosas na Medicina Veterinária permanece sendo a base de colírios compostos por substâncias que visam a diminuição da pressão intra-ocular (Anexo A). Tais drogas são classificadas, segundo o seu mecanismo de ação, em: agonistas adrenérgicos e inibidores da anidrase carbônica (que reduzem a produção do humor aquoso), agentes colinérgicos e análogos das prostaglandinas (que aumentam a drenagem do humor aquoso sem reduzir a sua produção) e antagonistas adrenérgicos (que induzem alterações na produção e na drenagem do humor aquoso) (WILLIS, 2004, RIBEIRO et al., 2007).

Dentre os agonistas adrenérgicos, a brimonidina é a mais utilizada por ser capaz de inibir a atividade da adenilato-ciclase, impedindo a conversão do trifosfato de adenosina em monofosfato de adenosina, diminuindo, conseqüentemente, a produção de humor aquoso (WILLIS, 2004). Embora diminua a PIO, ela muitas vezes causa miose e redução da frequência cardíaca (GELATT & MACKAY, 2002a).

Dorzolamida 2% e brinzolamida 1% são fármacos inibidores da anidrase carbônica responsáveis pela diminuição da produção do humor aquoso, uma vez que durante a produção do mesmo, íons bicarbonato são transportados juntamente com o cátion sódio para a câmara posterior do bulbo ocular, estabelecendo um gradiente osmótico que garante uma maior ou menor produção de humor aquoso (WILLIS, 2004; RIBEIRO et al., 2007).

Os agentes colinérgicos são representados pela pilocarpina que reduz a PIO por sua ação colinérgica, estimulando receptores muscarínicos do músculo ciliar da íris e promovendo miose; que por sua vez, promove a abertura do ângulo iridocorneano, aumentando o fluxo de drenagem do humor aquoso. Ela é contra-indicada em glaucomas secundários à uveíte por provocar quebra da barreira hemato-aquosa ocular elevando os níveis de proteína do humor aquoso (WILLIS, 2004; RIBEIRO et al., 2007).

Os análogos das prostaglandinas, após aplicação tópica, são biotransformados em prostaglandinas (incluindo a PGE 2 α), responsáveis pelo aumento da drenagem do humor aquoso pela via uveoescleral, na medida que promovem o remodelamento da matriz extracelular do músculo ciliar da íris (SAGARA et al., 1999; RIBEIRO et al., 2007). As vantagens dessa classe de antiglaucomatosos são: apresentam um efeito hipotensor ocular superior aos demais fármacos e são metabolizados rapidamente sem causar efeitos cardiopulmonares adversos (SOLTAU & ZIMMERMAN, 2002; RIBEIRO et al., 2007). Como desvantagem é citada a hiperemia conjuntival (FELDMAN, 2003). Atenção especial nos casos de glaucoma secundário à uveíte (onde o humor aquoso já é rico em prostaglandinas) e naqueles pacientes afácicos, pseudofácicos ou com luxação anterior da

lente (que por cursarem, às vezes, com miose, podem apresentar bloqueio pupilar), onde essa classe de medicação não deve ser utilizada (WILLIS, 2004; RIBEIRO et al., 2007).

Os antagonistas adrenérgicos ou β -bloqueadores são representados pelo timolol (β -bloqueador não-seletivo) que é responsável pelo bloqueio dos receptores β -adrenérgicos (β_1 e β_2) presentes no corpo ciliar, diminuindo a produção do humor aquoso. Embora amplamente utilizada na Medicina Veterinária, é importante ressaltarmos a presença de alguns efeitos colaterais como: miose (decorrente da ativação de receptores α -adrenérgicos no músculo esfíncter da íris), diminuição da frequência cardíaca e da pressão arterial sistêmica, arritmias e bloqueios cardíacos (associados com o bloqueio β_1 -adrenérgico), broncoespasmo e obstrução das vias aéreas (relacionados com bloqueio de receptores β_2 -adrenérgicos) (WILLIS, 2004; RIBEIRO et al., 2007).

3.7 Componentes do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um dos sistemas hormonais mais estudados no corpo humano em decorrência da sua complexidade que abrange a ação de uma cascata de enzimas, peptídeos e receptores envolvidos com diversos órgãos. Para que a dinâmica deste sistema possa ser compreendida, é necessário conhecer cada um dos componentes envolvidos.

O angiotensinogênio é uma glicoproteína constituída por 255 aminoácidos, sintetizado e liberado principalmente pelo fígado, mas também pode ser sintetizado a nível tecidual (IUSUF et al., 2008). Ele é clivado na circulação em angiotensina I (Ang I), por uma enzima chamada renina (Figura 4) (KAZUYUKI & FUMIO, 2007).

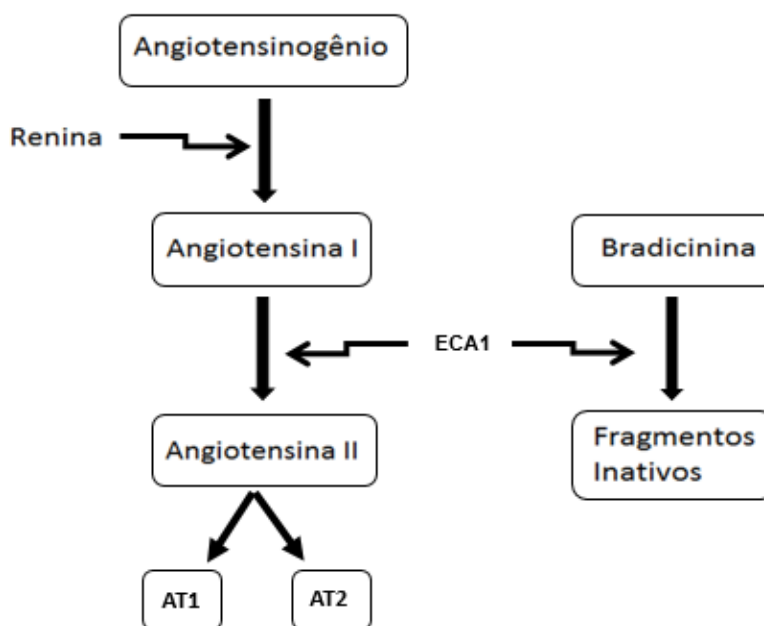


Figura 4: representação da cascata enzimática do sistema renina-angiotensina com o angiotensinogênio, a partir da renina, sendo transformado em angiotensina I que, por sua vez, é convertida em angiotensina II através da ação da ECA1, que é uma enzima também responsável pela degradação da bradicinina em fragmentos inativos.

A renina é uma aspartil protease sintetizada pelas células justaglomerulares dos rins. Sua forma ativa é composta por 340 aminoácidos, e é capaz de retirar um fragmento de dez aminoácidos a partir do angiotensinogênio, fragmento este chamado angiotensina I (Ang I) (JACKSON, 2006). O sistema nervoso simpático, a mácula densa e os fatores humorais exercem uma pressão na artéria renal influenciando a produção de renina; mas sua síntese também ocorre em outros órgãos como por exemplo no cérebro, pituitária, glândulas adrenais, coração, testículos e olhos (VAAJANEN, 2009).

A enzima conversora de angiotensina (ECA1) remove o dipeptídeo His-Leu do terminal carboxilo de Ang I e dá origem ao mais potente octapéptido chamado angiotensina II (VICKERS et al., 2002). ECA1 é predominantemente expressa em elevadas concentrações na superfície das células da circulação pulmonar e tem um papel significativo no SRA circulante, na formação de Ang II a partir de Ang I, e na degradação de outras angiotensinas à formas inativas (VAAJANEN, 2009). ECA1 tem efeito vasopressivo e também é conhecida como quininase II por catalisar a cascata de bradicinina, que é um nonapeptídeo formado a partir de cininogênios produzidos principalmente pelos hepatócitos (SU, 2006). A bradicinina dilata os vasos sanguíneos ao estimular a produção de óxido nítrico e prostaciclina neste local.

Angiotensina II é um peptídeo formado a partir da ação da ECA1 sobre a angiotensina I. Ela causa vasoconstrição e vai para os rins via corrente sanguínea, onde, nos túbulos dos néfrons, estimulará a reabsorção de sódio e água, aumentando assim a volemia e, conseqüentemente, a pressão. Simultaneamente, a Ang II também se dirige ao córtex das glândulas suprarrenais, estimulando a liberação do hormônio aldosterona, que se dirige aos rins e estimula mais ainda a absorção de sódio e água, aumentando ainda mais a volemia e a pressão. Ang II também possui numerosas funções conhecidas no controle da pressão arterial ao interagir com receptores na membrana celular das células alvo, os chamados receptores AT1 e AT2 (KAZUYUKI & FUMIO, 2007; HIROOKA & SHIRAGA, 2007).

O receptor AT1 faz parte do grupo de receptores acoplados a proteína G que, quando se liga quimicamente à Ang II, provoca uma série de reações celulares, sendo a vasoconstrição uma das mais importantes. Além de vasoconstrição, essa ligação promove: crescimento celular, ativação do sistema nervoso simpático, diminuição do barorreflexo, aumento da concentração de aldosterona no sangue, diminuição da concentração de renina no sangue e aumento da formação de radicais livres derivados do oxigênio (DE GASPARO et al., 2000).

O receptor AT2 também é uma proteína acoplada à membrana celular que possui ações antagonistas às do receptor AT1, como por exemplo: vasodilatação, antihipertensão, diminuição da proliferação celular, diminuição da angiogênese e aumento da natriurese (DE GASPARO et al., 2000; VAAJANEN, 2009).

Além da ação da Ang II sobre os receptores AT1 e AT2, esse peptídeo pode ser convertido à angiotensina (1-7) através da atividade da carboxipeptidase ECA2 (enzima conversora de Ang II) (Figura 5). ECA2 é um homólogo estruturalmente relacionado a ECA1, com 42% de identidade de sequência desta proteína (VICKERS et al., 2002), mas ele age contrário às carboxipeptidases e aumenta a formação de Ang (1-7) a partir de Ang II e de Ang (1-9) a partir de Ang I (IUSUF et al., 2008, VAAJANEN, 2009).

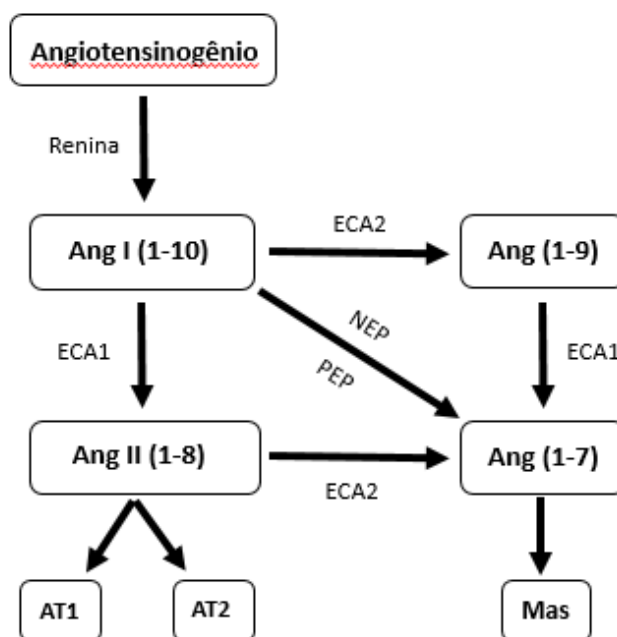


Figura 5: representação da cascata enzimática do sistema renina-angiotensina com o angiotensinogênio, a partir da renina, sendo transformado em angiotensina I que por sua vez é convertida através de ECA em angiotensina II que pode se ligar aos receptores AT1 e AT2. ECA2 pode degradar angiotensina I e angiotensina II em angiotensinas (1-9) e (1-7) respectivamente. Angiotensina (1-9) é degradada em (1-7) pela ECA. Enzimas Endopeptidase neutra (NEP) e Prolil endopeptidase (PEP) degradam angiotensina I em (1-7) que pode agir nos receptores AT2 ou Mas.

A função da Ang (1-9) ainda não é muito bem definida, mas é sabido que ela exerce forte inibição sobre ECA1 e serve como substrato para a formação de Ang (1-7) (IUSUF et al., 2008). Ela também ativa a bradicinina, aumenta a formação de óxido nítrico e a liberação dos precursores do ácido araquidônico (DONOGHUE et al., 2000; VAAJANEN, 2009).

Ang (1-7) e Ang II exercem ações opostas, sugerindo que Ang (1-7) exibe uma interação importante com o sistema calicreína-quinina, e assim, tem um efeito vasodilatador. Este mecanismo envolve a inibição da ECA1, a ativação do receptor de bradicinina e a liberação de óxido nítrico (SANTOS et al., 2003).

Ang (1-7) é também considerada um ligante endógeno do receptor Mas (SANTOS et al., 2003), que é distinto dos receptores AT1 e AT2. O receptor Mas é uma proteína acoplada à membrana celular que media ações de vasodilatação, modulação do sistema nervoso central e aumento da proliferação celular, da angiogênese, da natriurese e do barorreflexo. In vivo, o receptor Mas atua de forma antagonista com o receptor de AT1, porém pode hetero-oligomerizar com o receptor AT1 e, deste modo, inibir as ações de Ang II (KOSTENIS et al., 2005). O aceturato de diminazeno (DIZE) é um ativador de ECA2 que contribui com a formação de Ang (1-7) e sua ligação com o receptor Mas (FOUREAUX et al., 2015). AVE 0991 é um agonista do receptor Mas, capaz de mimetizar alguns dos efeitos da Ang (1-7) (LEMOS et al., 2005). Pelo menos dois antagonistas conhecidos do receptor Mas foram identificadas como D-Ala-angiotensina (1-7) (A779) e Pro-angiotensina-(1-7) (VAAJANEN, 2009).

3.8 Sistema Renina-Angiotensina (SRA) e o Globo Ocular

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um importante papel na vasoconstrição, regulação do balanço eletrolítico e remodelação vascular. Técnicas da biologia molecular (PCR) comprovaram a existência desse sistema dentro do globo ocular, ao revelarem que seus componentes são sintetizados no tecido ocular (BERKA et al., 1995; RAMIREZ et al., 1996; WAGNER et al., 1996; VAAJANEN, 2009).

Depois disso, houve um outro debate sobre a origem do SRA: angiotensina intraocular é originada pela produção local ou a partir do sangue? Os estudos demonstraram que a angiotensina I, angiotensina II e angiotensinogênio são incapazes de passar a barreira sangue-cérebro (DANSER et al., 1994) e, como as barreiras entre os olhos e sangue circulante são comparáveis a esta (CUNHA-VAZ, 1979), conclui-se que a angiotensina intraocular é originada pela produção local.

O SRA, como visto anteriormente, é um sistema de transformação de peptídeos que ocorre em diversos locais, inclusive no globo ocular. Neste órgão em especial, a bradicinina quando em níveis elevados promove a síntese de prostaglandinas, particularmente a PGF₂ α , que é conhecida por aumentar fluxo uveoscleral do humor aquoso (CRAWFORD & KAUFMAN, 1987) e, conseqüentemente, por diminuir a pressão intra-ocular em pacientes com hipertensão ocular e glaucoma primário de ângulo aberto (CONSTAD et al., 1988).

Na prática oftálmica, a bradicinina é um potente ativador da via de óxido nítrico da L-arginina e provoca relaxamento do endotélio em vasos sanguíneos isolados, que libera óxido nítrico através de receptores β_2 , e aumenta o fluxo no olho perfundido (CRAWFORD & KAUFMAN, 1987).

Para evidenciar a influência da ECA em pacientes glaucomatosos, os componentes do SRA foram avaliados no humor aquoso de pacientes normais e de portadores do glaucoma. O nível de ECA no humor aquoso de pacientes glaucomatosos foi 40 a 47% maior que nos pacientes normais, evidenciando seu papel importante nessa patologia ocular (BOROVIC et al., 2009).

Numa pesquisa realizada em coelhos induzidos ao glaucoma, foi comparada a redução da PIO após a instilação de colírios de pilocarpina 1% (droga colinérgica) e perindopril 1% (inibidor da ECA). O primeiro reduziu a PIO de $34,4 \pm 0,81$ mmHg para $20,15 \pm 0,69$ mmHg, enquanto que o segundo reduziu a PIO de $35 \pm 1,38$ mmHg para $22,45 \pm 1,42$, indicando que ambas as drogas, embora com mecanismos de ação diferentes, tiveram um efeito parecido na regulação da PIO (MEHTA et al., 2010).

Outros colírios compostos por inibidores de ECA também foram testados experimentalmente em coelhos, como é o caso do SCH 33861 a 0,001%, captopril 0,1% e enalapril 0,01%, em comparação com o maleato de timolol 0,5% (um agente β -bloqueador). Todos esses fármacos apresentaram redução semelhante nos valores da PIO: SCH 33861 redução de $4,8 \pm 0,5$ mmHg, captopril 0,1% redução de $4,0 \pm 0,4$ mmHg, enalapril 0,01% redução de $4,7\% \pm 0,4$ mmHg e o timolol 0,5% redução de $4,5 \pm 0,3\%$ mmHg; além de nenhuma medicação causar qualquer tipo de irritação ocular (WATKINS et al., 1987).

Através desses testes foi possível observar que os inibidores da ECA são muito importantes na regulação da pressão intra-ocular; uma vez que o mecanismo de ação deles envolve mais pronunciadamente a formação do humor aquoso, mas também possui um papel importante na sua drenagem (KAZUYUKI & FUMIO, 2007).

Com relação à angiotensina II foi mostrado recentemente que além dela ter uma potente ação vasoconstritora e estimular a liberação de aldosterona, ela também atua como fator de crescimento e imunomodulador em fenômenos de fibrose, proliferação e apoptose celular (MUÑOZ-NEGRETE, 2009).

A angiotensina II ainda pode causar um aumento na concentração de sódio, devido a ativação citoplasmática do transporte de Na^+ / H^+ . Dessa forma, como os mecanismos relacionados com a movimentação de sódio são fatores patogênicos comuns em epitélio ciliar e tubular renal; isso pode explicar a coexistência de glaucoma e hipertensão arterial sistêmica (HOY & DELAMERE, 2002).

Um estudo recentemente publicado (VAAJANEN et al., 2008) elucidou o efeito da angiotensina II na PIO e no fluxo do humor aquoso. Observou que tanto a aplicação tópica, quanto intravítrea de angiotensina II, aumentam significativamente a resistência do humor aquoso e, conseqüentemente elevam a PIO.

As mais conhecidas ações fisiológicas da angiotensina II são provocadas quando ela age nos receptores AT1 incluindo vasoconstrição, homeostase de eletrólitos, modulação do comportamento de beber e a estimulação da liberação de hormônio do crescimento (CULMAN et al., 1995; ITO et al., 1995; AGUILERA & KISS, 1996). As ações no receptor AT2 são menos bem definidas, mas possivelmente se opõem as ações do receptor AT1, incluindo a vasodilatação e a apoptose (VAAJANEN & VAPAATALO, 2011).

Para evidenciar a influência da angiotensina II sobre fluxo uveoscleral mediada por receptores AT1, Wang e colaboradores (2005) utilizaram o olmesartan 2% e 4% (CS-088), um receptor antagonista da angiotensina II tipo AT1, topicamente em macacos com glaucoma unilateral induzido por laser. Redução significativamente maior da PIO, com a concentração de 4%, foi observada logo após a primeira administração e a duração desse efeito permaneceu por 18 horas. Além disso, ele avaliou que a aplicação a cada 12 horas diminuiu ainda mais a PIO, caracterizando um efeito dose-dependente.

3.9 Novas Descobertas Sobre o SRA no Globo Ocular

As novas descobertas estão relacionadas com o importante componente do SRA que é a ECA2. Como já visto, ela pode degradar a Ang I em Ang (1-9) e a Ang II em Ang (1-7) biologicamente ativa, que por sua vez e, em muitos aspectos, age em oposição a Ang II (TIKELLIS et al., 2011). Ang (1-7) atua principalmente através de um novo tipo de receptor de angiotensina, o receptor Mas, que é um receptor acoplado a proteína G codificado pelo proto-oncogene Mas encontrado pela primeira vez no rim do rato (SANTOS et al., 2003). A ativação do receptor Mas provoca efeitos opostos à ativação do receptor AT1, como a vasodilatação, anti-proliferação e antifibrose, e desempenha um importante papel na homeostase do volume de fluido (KOSTENIS et al., 2005). Todas estas vias alternativas para a produção e degradação de Ang II são importantes fisio e patologicamente também à nível ocular (VAAJANEN & VAPAATALO, 2011).

Com base nessas descobertas, o novo desenvolvimento de anti-hipertensivos sistêmicos envolvendo o SRA está se concentrando nos efeitos positivos resultarem da estimulação do eixo ECA2-Ang (1-7)-Mas, além da inibição do eixo clássico de ECA1-Ang II-AT1. Baseado nisso, foi investigada a expressão e a função do SRA em diferentes tecidos oculares in vitro e in vivo (Anexo B). Os principais resultados foram vistos na expressão do

receptor Mas para Ang (1-7) (VAAJANEN et al., 2009), bem como na ação de ECA2 (LUHTALA et al., 2009). A expressão dos receptores Mas (RT-PCR) foi encontrada no corpo ciliar e na retina. Por conseguinte, a Ang (1-7), um agonista específico do receptor Mas, reduziu a PIO quando administrado via intravítrea em coelhos com pressão intra-ocular normal (VAAJANEN et al., 2008). O efeito de redução da PIO foi pequeno (1-2 mmHg), mas consistente durante as primeiras 6 horas nos olhos normotensos com PIO basal de aproximadamente 18 mmHg. A redução da PIO foi abolida por um antagonista do receptor Mas (A779). O mecanismo do efeito de redução da pressão intra-ocular não é óbvio, mas Vaajanen e colaboradores (2011) sugerem que a Ang (1-7) reduz a pressão intra-ocular através da redução da formação de humor aquoso.

Outro cenário bastante interessante ocorre após o bloqueio seletivo do receptor AT1, pois em seguida observa-se o aumento da secreção de renina, levando a um aumento da formação de Ang I e Ang II, que então atua sobre o receptor AT2 produzindo efeitos que geralmente são contrários aos do receptor AT1 (GASPARO et al., 2000). Além disso, o aumento da Ang I e Ang II podem ocasionar a formação de Ang (1-7), levando a um aumento da ativação do receptor Mas (GIESE & SPETH, 2013).

Em contrapartida, inibidores direto da renina, inibem apenas a formação de Ang I a partir do angiotensinogênio, apresentando ações diferentes quando comparados com os inibidores da ECA. Eles não afetam o metabolismo da bradicinina, não promovem ativação do receptor AT2 e, ainda, evitam a formação de Ang (1-7). Bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos como é o caso do maleato de timolol, também são inibidores indireto da renina, na medida em que eles inibem a liberação de renina a partir do rim em resposta à ativação do sistema nervoso simpático. Porém, os bloqueadores beta-adrenérgicos são considerados de eleição no tratamento do glaucoma humano, porque eles interferem diretamente com os efeitos vasoconstritores dos nervos simpáticos, potencializando assim o efeito dos inibidores de ECA (GIESE & SPETH, 2013).

3.10 Manipulação de Colírios

Os fármacos oftalmológicos podem ser administrados por vias tópica, subconjuntival, retrobulbar ou intra-ocular (SLATTER, 2005). A via adequada depende das características do fármaco (solubilidade, formulações disponíveis), fisiopatologia (gravidade e localização da doença, presença ou ausência de barreiras oculares normais), fatores do paciente (espécie, comportamento do animal) e fatores humanos (capacidade para administrar o tratamento nas frequências recomendadas, custo dos tratamentos) (ADAMS, 2003).

A farmacocinética depende da via de administração, pois aqueles aplicados por via tópica, por exemplo, são usados principalmente pelos seus efeitos a nível de conjuntiva, córnea, câmara anterior e posterior, íris e corpo ciliar; sendo que a ação desejada dependerá da sua absorção pelo epitélio do saco conjuntival. O efeito desejado deve ser alcançado sem causar efeitos colaterais e sem haver absorção sistêmica (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Os fármacos administrados por via tópica são diluídos no filme lacrimal e eliminados, em sua grande maioria, pelas vias lacrimais. A evaporação também ocorre, mas é responsável por uma pequena perda do fármaco disponível. Por fim, uma porção do fármaco é absorvida e levada pela circulação conjuntival (ADAMS, 2003).

No caso do maleato de timolol 0,5% (Allergan Produtos Farmacêuticos LTDA), por exemplo, a concentração de pico foi 898 ng/ml no humor aquoso uma hora após a administração em humanos submetidos a cirurgia de catarata (sendo a meia vida do timolol no plasma de cerca de 4 a 6 horas). Parte da dose é absorvida sistemicamente onde é extensamente metabolizada no fígado e excretada pelos rins.

Para a instilação dessas soluções preconiza-se um volume de gota aproximado de 20 microlitros, pois a capacidade de retenção do saco conjuntival é de 25 a 30 microlitros e o excedente desse volume será drenado pela via lacrimal ou transbordará pelas margens palpebrais manchando e sujando os pelos dessa região. Sempre que houver necessidade de instilar uma segunda gota do mesmo ou de outro colírio, é recomendado dar um intervalo de no mínimo 5 minutos para que cada gota seja absorvida sem que haja drenagem excessiva ou transbordamento da solução pelas margens palpebrais (BATISTUZZO et al., 2011).

A viscosidade das soluções é de extrema importância para a oftalmologia, pois aquelas com baixa viscosidade são drenadas pela via lacrimal de forma rápida, diminuindo, assim, o tempo de absorção (SLATTER, 2005). Os adjuvantes mais utilizados para essa finalidade são a hidroxipropilmetilcelulose e o álcool polivinílico. As substâncias tensoativas também contribuem para a melhor absorção das soluções, a medida que diminuem a tensão superficial da solução, facilitando a mistura do colírio com o filme lacrimal e a difusão dos princípios ativos na superfície do epitélio corneano (BATISTUZZO et al., 2011).

Todos os constituintes das fórmulas e os frascos ou bisnagas devem ser esterilizados de maneira eficiente e controlada com a finalidade de destruir e/ou remover todas as formas possíveis de multiplicação e desenvolvimento durante o período de conservação do produto (ADAMS, 2003). Normalmente a esterilização é realizada por filtração no caso de soluções, por vapor para produtos plásticos, por calor para embalagens de vidro, por óxido de etileno para materiais secos e por radiação ionizante para materiais sólidos. O envase deve ser sempre asséptico e o prazo de validade deve ser determinado através de estudos de estabilidade (BATISTUZZO et al., 2011).

As soluções oftálmicas devem possuir uma osmolaridade adequada para sua melhor absorção no globo ocular. Por esse motivo, preconiza-se manipular fórmulas isotônicas com os tecidos oculares (ADAMS, 2003; SLATTER, 2005; BATISTUZZO et al., 2011).

Todas as formulações devem estar dentro do valor normal do pH do filme lacrimal, que corresponde aproximadamente a 7,4 (SLATTER, 2005; GOODMAN & GILMAN, 2012). Valores mais ácidos ou alcalinos tendem a causar irritações oculares e podem afetar a absorção da droga. Com essa finalidade, muitas vezes é necessário utilizar um sistema tampão que ajuda a restabelecer o pH próximo ao referido (BATISTUZZO et al., 2011).

Outro fator importante durante a manipulação de colírios é quanto à solubilidade do fármaco, pois elas precisam ser solúveis o suficiente para não precipitarem durante o período de armazenamento (ADAMS, 2003; SLATTER, 2005; BATISTUZZO et al., 2011). Portanto, é importante que os rótulos contenham informações como: agite antes de utilizar, conserve o produto na geladeira ou mantenha em local com ausência de luz, para garantir a estabilidade e conservação das formulações (BATISTUZZO et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Princípios Éticos na Experimentação Animal

A Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP – UFRRJ) vinculada ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da UFRRJ deu parecer que este projeto atende os princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem-estar animal conforme a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV. O número do protocolo licenciado para submissão do projeto de pesquisa à comissão de ética é 112/2014 (Anexo C).

4.2 Grupo de Animais

Durante o experimento foram empregados ao todo 18 cães (*Canis familiaris*), da raça Beagle, machos e fêmeas (em anestro) com idade entre 1 e 5 anos, identificados por chip e mantidos em canis com boas condições de higiene, com abrigo, água e comida à vontade. Todos os cães pertencentes ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) apresentavam-se hígidos clinicamente e sem alterações oculares durante o exame oftalmológico antecedente ao experimento.

Esses animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (A, B e C), sendo que no grupo A avaliou-se a ação do colírio comercial de cloridrato de timolol 0,5% (Allergan Produtos Farmacêuticos LTDA) durante 14 dias, no grupo B avaliou-se a ação do colírio manipulado de captopril na concentração de 0,1% por 7 dias e de 0,5% por outros 7 dias e, no grupo C avaliou-se a ação do colírio manipulado de aceturato de diminazeno (DIZE) na concentração de 0,1% por 7 dias e de 0,5% por outros 7 dias.

4.3 Manipulação dos Colírios

No Laboratório de Farmacologia da UFRRJ, sob supervisão do professor doutor Wellington da Silva Côrtes, foram manipulados os colírios de captopril nas concentrações de 0,1% e 0,5% e DIZE a 0,1% e 0,5% com a utilização dos reagentes: hidroxipropil metilcelulose (5 mg/mL), fosfato de sódio dibásico (10,4 mg/mL), fosfato de sódio monobásico (2,4 mg/mL), água destilada purificada e cloreto de benzalcônio (0,1 mg/mL) (ABRAMS, 1991).

A hidroxipropil metilcelulose foi utilizada para conferir a viscosidade necessária para a solução impregnar na superfície ocular e, assim, ser absorvida. O cloreto de benzalcônio age como conservante e também como um agente de tensão superficial favorecendo o contato do colírio com o epitélio corneano e, conseqüentemente, contribuindo para a absorção do mesmo. O fosfato de sódio monobásico e dibásico são usados como agentes tamponadores e, principalmente, como reguladores do pH. A água destilada purificada contribuiu para a diluição dos reagentes.

A concentração de 0,1% foi preparada inicialmente com base na revisão de literatura (WATHINS et al., 1987; ABRAMS et al., 1991; VAAJANEN et al., 2008; FOUREAUX et al., 2015), a qual relata o uso de doses numa concentração igual ou menor que essa, em animais como ratos, coelhos e/ou cães. Durante a preparação dos colírios nessa concentração foi observado uma solução transparente e inodora, facilmente aplicável nos sacos conjuntivais dos cães.

Trabalhando com a farmacotécnica desses fármacos e reagentes foi realizada a manipulação dos colírios de captopril e DIZE numa concentração 10 vezes superior. O colírio de captopril foi obtido com a formação de uma solução transparente e inodora como a anterior; porém na formulação do colírio de DIZE houve a formação de uma solução coloidal inodora, de coloração amarelada, semelhante à um mousse de maracujá, com inúmeros grânulos que impossibilitou qualquer tipo de administração a nível ocular.

Como não houve sucesso com a formulação do colírio de DIZE a 1%, novo teste foi realizado com as concentrações de ambos os fármacos à 0,5%, pois o objetivo era comparar a ação dos diferentes fármacos nas mesmas concentrações. Dessa vez foram obtidas soluções transparentes, inodoras e facilmente aplicáveis nos sacos conjuntivais dos cães.

Após a formulação dos colírios, todos passaram pelo processo de filtração em membrana esterilizante 0,2 μm , envase dentro do fluxo laminar e foram conservados a uma temperatura entre 2 e 8 °C.

4.4 Tonometria

A pressão intraocular foi mensurada através do tonometro de aplanção (Tono-Pen XL, Medtronic, FL, U.S.A.) que foi calibrado todos os dias antes do uso pelo mesmo avaliador (Figura 6). Antes da mensuração foi instilado topicamente uma gota do colírio anestésico compostos por cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1% e, em seguida, três leituras foram feitas para o cálculo da média da PIO em cada olho, visando diminuir o desvio padrão das leituras.



Figura 6: aferição da pressão intra-ocular de um cão da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2015.

4.5 Mensuração da Frequência Cardíaca (FC)

A frequência cardíaca foi mensurada 5 vezes sempre pelo mesmo avaliador através do ausculta com um estetoscópio (Littmann Master Classic II) para o cálculo da média da FC de cada animal.

4.6 Mensuração da Pressão Arterial Sistêmica (PAS)

Primeiramente, foi realizada tricotomia da região próxima ao coxim do membro anterior direito, onde o pulso era palpável. Aplicou-se gel sobre essa região para posicionar o Doppler vascular (Medmega, modelo DV610, Ind. Equip. Médicos Ltda - Franca, SP). Colocou-se um manguito, de largura correspondente a 40% da circunferência do membro, sobre a região radioulnar e o mesmo foi inflado até aproximadamente 30 mmHg superior à pressão necessária para se obliterar o sinal de pulso audível e, em seguida, lentamente desinflado. A pressão sistólica foi determinada no momento em que o sinal de pulso se tornou audível novamente e, após 5 aferições em cada animal, foi calculada a média.

Seguindo as condutas de Cabral e colaboradores (2010), somente a pressão arterial sistólica foi aferida, pois seus dados equiparam aos obtidos pela aferição pelo método oscilométrico, que não foi o de escolha nesse trabalho pois vários autores relatam maior dificuldade na aferição, uma vez que o animal teria de permanecer sem se mover durante todo o procedimento, o que nem sempre foi possível. A pressão arterial diastólica pelo método Doppler não foi avaliada por ser bastante subjetiva e distinguir do método oscilométrico; uma vez que depende das impressões pessoais do examinador.

4.7 Protocolo Experimental

Inicialmente (dia 0), cada um dos 18 cães, pertencentes aos grupos A, B e C tiveram sua produção da porção aquosa do filme lacrimal aferida pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS1) (Figura 7) e passaram pela coleta sanguínea para a dosagem da concentração da enzima conversora de angiotensina (ECA1) do soro que foi realizada pelo método cinético-enzimático pelo Laboratório de Tecnologia em Sanidade Animal (TECSA) localizado em Belo Horizonte – MG.



Figura 7: Teste Lacrimal de Schirmer (TLS1) em um cão da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2015.

Durante três dias consecutivos e em três horários distintos (6h, 12h e 18h) todos os animais passaram por quatro exames, seguindo sempre a mesma ordem: avaliação do diâmetro pupilar, aferição da pressão intraocular, aferição da frequência cardíaca e da pressão arterial sistêmica.

Em seguida (dia 4), cada um dos animais dos grupos tiveram o olho esquerdo (Figura 8) submetido aos protocolos pré-determinados (Figura 9) inicialmente com 1 gota (contendo 20 μ L), a cada 12 horas (sempre nos mesmos horários 6h e 18h), dos respectivos colírios: colírio comercial de cloridrato de timolol 0,5% no grupo A, colírio manipulado de captopril na concentração de 0,1% no grupo B e colírio manipulado de acetato de diminazeno (DIZE) na concentração de 0,1% no grupo C. Os olhos adelfos de todos os animais foram usados como grupo controle e, durante 7 dias, todos os cães passaram pelos mesmos exames iniciais, sempre nos mesmos horários (6h, 12h e 18h), logo após o término da instilação dos colírios.



Figura 8: instilação do colírio DIZE 0,5% em um cão da raça Beagle, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2015.

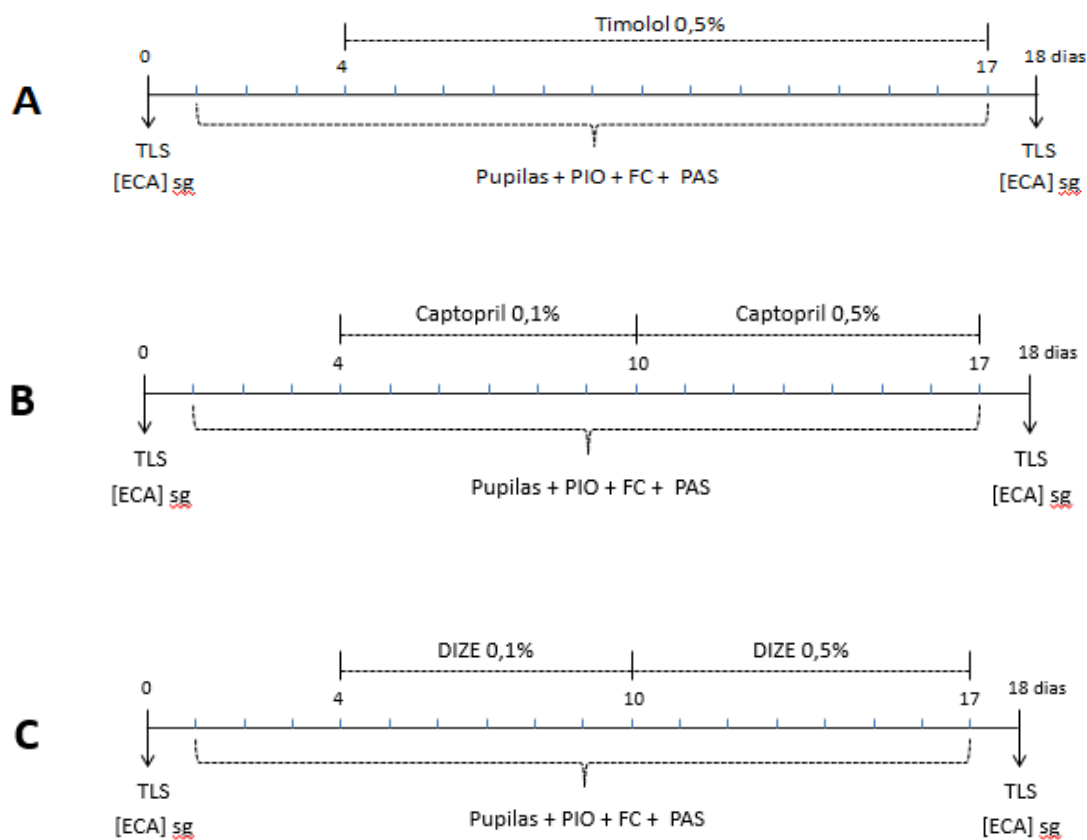


Figura 9: diagrama representando o protocolo experimental usado neste estudo: (A) protocolo tópico com timolol 0,5%, 2 vezes ao dia, durante 14 dias; (B) protocolo tópico com captopril 0,1%, 2 vezes ao dia, por 7 dias e 0,5%, 2 vezes ao dia por outros 7 dias, e (C) protocolo tópico com DIZE 0,1%, 2 vezes ao dia por 7 dias e 0,5%, 2 vezes ao dia por outros 7 dias. Em todos os grupos, nos dias 0 a 18 foi realizado o Teste Lacrimal de Schirmer (TLS) e coletado sangue para dosagem da enzima conversora de angiotensina (ECA). As pupilas, pressão intraocular (PIO), frequência cardíaca (FC) e pressão arterial sistêmica (PAS) foram avaliadas 3 dias antes de iniciar o protocolo experimental e durante os 14 dias de experimento sempre nos horários de 6hs, 12hs e 18hs.

Visto que os animais, de todos os grupos, não apresentaram nenhuma alteração sistêmica ou ocular, que não fosse a redução da PIO; novas concentrações dos colírios que atuam no eixo SRA foram protocoladas numa concentração 10 vezes maior. Porém, como já mencionado anteriormente, não foi possível manipular o colírio de DIZE 1%; portanto novas soluções foram formuladas com sucesso a partir do captopril a 0,5% e do DIZE a 0,5% sempre utilizando os mesmos reagentes.

Durante 7 dias foi instilado, no olho esquerdo, 1 gota (contendo 20 μ L), a cada 12 horas (sempre nos mesmos horários 6 h e 18 h) do colírio de captopril 0,5% nos cães do grupo B e do colírio de DIZE 0,5% nos cães do grupo C. Os animais do grupo A mantiveram mais 7 dias nas mesmas concentrações do colírio comercial de timolol 0,5%. Os olhos adelfos de todos os animais foram usados como grupo controle e, durante esses 7 dias, todos os cães passaram pelos mesmos exames iniciais, sempre nos mesmos horários (6h, 12h e 18h), logo após o término da instilação dos colírios.

Depois disso, novamente cada um dos 18 cães tiveram sua produção da porção aquosa do filme lacrimal aferida pelo Teste Lacrimal de Schirmer (TLS1) e passaram pela coleta sanguínea para dosagem da concentração da enzima conversora de angiotensina (ECA) do soro que foi realizada pelo mesmo laboratório.

4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de ANOVA para verificar a natureza das variáveis deste estudo. Foram utilizados o teste de Tukey e o de Pearson para correlacionar as variáveis paramétricas entre si, prevalecendo significância estatística de 95% ($p < 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis AOV, usado para determinação do caráter não paramétrico de algumas variáveis, foi empregado com significância estatística de 95% ($p < 0,05$), a fim de estabelecer a interpretação adequada das hipóteses. O software empregado para a realização das referidas análises acima descritas foi o Statistix® versão 9.0 (Analytical Software, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sinais Clínicos

Durante os 14 dias de instilações dos colírios nos sacos conjuntivais dos diversos cães, não se observou qualquer tipo de hiperemia conjuntival, prurido, quemose, congestão episcleral, edema corneano, alteração no crescimento ou coloração dos cílios. Nenhum animal teve qualquer tipo de alteração oftalmológica ou comportamental no período do experimento e após o mesmo; comprovando, assim, a segurança na utilização desses novos colírios.

5.2 Avaliação da Atividade de ECA1

Os resultados obtidos da atividade de ECA1 pelo laboratório TECSA, utilizando o método cinético-enzimático, revelaram que os valores em todos os protocolos foram maiores no último dia do experimento (Quadro 2), seguindo sempre os valores de referência de 8 a 45 u/L. O grupo A (GA) foi o que teve maior aumento nos valores de ECA1, seguido do grupo B (GB) e C (GC), porém não é possível levar em consideração os valores do grupo A porque foram obtidos apenas a dosagem de ECA1 de 2 animais deste grupo em decorrência da coagulação do sangue durante o envio das amostras dos demais animais, o que impossibilitou a desoragem e dosagem de ECA1.

Quadro 2: médias das concentrações de ECA1 obtidas nos dias 0 e 18 dos grupos tratados respectivamente com timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC).

| Protocolos | Timolol (GA) | | Captopril (GB) | | DIZE (GC) | |
|---------------|--------------|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| | ECA1 (0) | ECA1 (18) | ECA1 (0) | ECA1 (18) | ECA1 (0) | ECA1 (18) |
| Animais | 2 | 2 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Média | 50,00 | 69,00 | 43,80 | 56,00 | 55,20 | 57,00 |
| Desvio Padrão | 8,48 | 7,07 | 12,13 | 12,02 | 36,21 | 25,64 |

ECA1 do grupo B teve um aumento significativo entre o dia 0 e dia 18 ($p=0,0483$; $r^2=0,7017$) que se opõe aos resultados de Abrans e colaboradores (1991), os quais observaram uma diminuição (17,5%) dos valores de ECA1 no soro dos cinco cães que foram tratados topicamente com o colírio de SCH 33861, um inibidor de ECA1 formulado pela Schering Corporation.

Os valores de ECA1 do grupo C também tiveram um aumento significativo ($p=0,0360$), porém estatisticamente o percentual de vezes que essa elevação pode ser vista em animais tratados com tal droga ($r^2=0,7527$) foi maior que a observada no grupo B.

Mesmo com esse alto percentual estatístico dos grupos B ($r^2=0,7017$) e C ($r^2=0,7527$), não é possível afirmar que o captopril (um inibidor de ECA1) e o DIZE (um ativador de ECA2), tendem a elevar os valores de ECA1 (Figura 10); pois em decorrência do curto período experimental, essas drogas podem fisiologicamente ter causado um *feedback* positivo nesses primeiros dias de tratamento que com o tempo seria compensado pelo organismo

gerando então uma redução nos valores de ECA1, como seria o esperado em se tratando do eixo SRAA com um inidor de ECA1 e um ativador de ECA2.

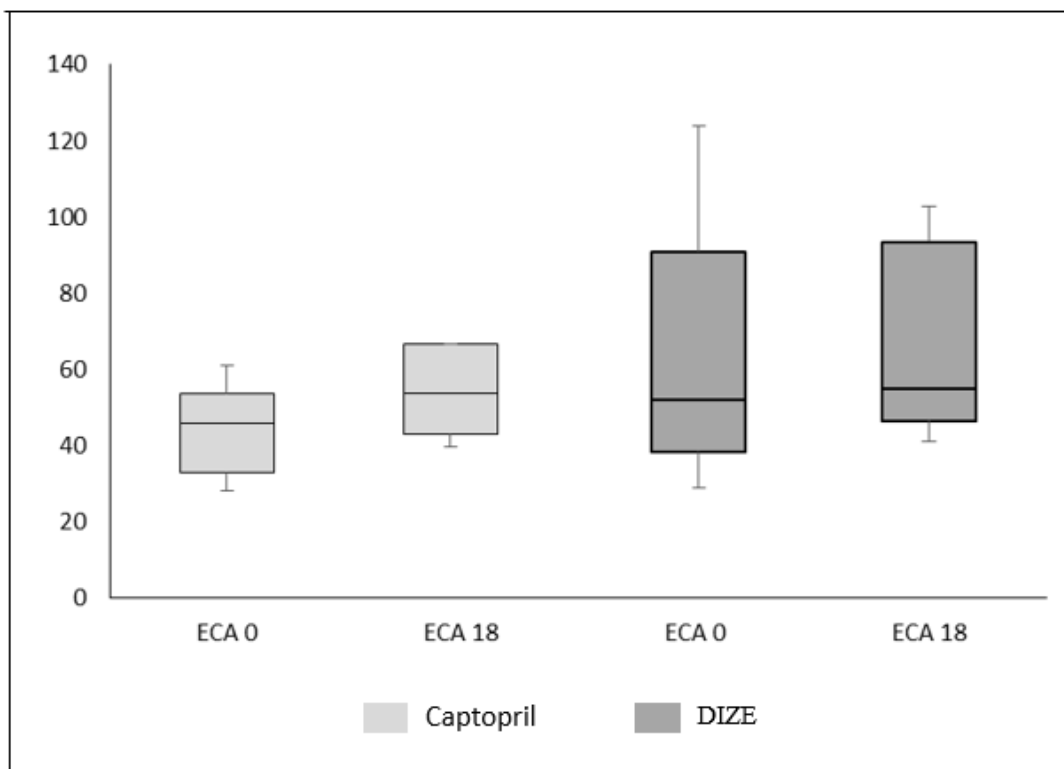


Figura 10: médias dos valores de ECA1 obtidos nos dias 0 e 18 dos cães dos grupos captopril e DIZE.

5.3 Avaliação do TLS1

Os valores do TLS1 do olho direito (controle) de todos os cães do experimento aumentaram entre o primeiro e o último dia (Quadro 3), sendo que o grupo do DIZE foi o que mais se elevou (GC= +4,666 mm/min.), seguido do grupo do timolol (GA= +4,337 mm/min.) e do captopril (GB= +4,16). Esse aumento no TLS1 não teve diferença estatística entre os grupos porque se deve à produção reflexa do filme lacrimal (SLATTER, 2004), uma vez que os olhos esquerdos estavam sofrendo a ação da instilação das respectivas drogas.

Quadro 3: médias e desvio-padrão dos valores de TLS1 obtidos nos dias 0 e 18 dos olhos direitos usados como controle para os respectivos grupos: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC).

| Protocolos OD | Timolol (GA) | | Captopril (GB) | | DIZE (GC) | |
|----------------------|--------------|--------|----------------|--------|-----------|--------|
| | TLS 0 | TLS 18 | TLS 0 | TLS 18 | TLS 0 | TLS 18 |
| Animais | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Média | 17,33 | 21,66 | 17,83 | 22,0 | 19,16 | 23,83 |
| Desvio Padrão | 3,07 | 5,16 | 2,22 | 2,82 | 2,92 | 7,02 |

Os valores do TLS1 do olho esquerdo (tratados) de todos os cães do experimento aumentaram entre o primeiro e o último dia (Quadro 4), sendo que o grupo do timolol foi o

que mais se elevou (GA= +6,0 mm/min), seguido do grupo do captopril (GB= +4,167 mm/min) e do DIZE (GC= +2,666 mm/min).

Quadro 4: médias e desvio-padrão dos valores de TLS1 obtidos nos dias 0 e 18 dos olhos esquerdos dos grupos de cães tratados respectivamente com: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC).

| Protocolos OE | Timolol | | Captopril | | DIZE | |
|----------------------|---------|--------|-----------|--------|-------|--------|
| | TLS 0 | TLS 18 | TLS 0 | TLS 18 | TLS 0 | TLS 18 |
| Animais | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Média | 18,0 | 24,0 | 19,83 | 24,0 | 20,66 | 23,33 |
| Desvio Padrão | 5,51 | 4,77 | 2,04 | 2,75 | 3,44 | 5,75 |

Quando são comparados os resultados obtidos entre olhos direito e esquerdo de cada grupo, observa-se que no final do tratamento do grupo do timolol (dia 18) houve um aumento significativo ($p= 0,0384$) dos valores de TLS1 (Figura 11). Esse aumento se contrapõe com o descrito por diversos autores (KUNER et al., 2013; BONOMI et al., 1980), que relatam uma diminuição do TLS1 nos animais e em humanos tratados a longo prazo com o timolol.

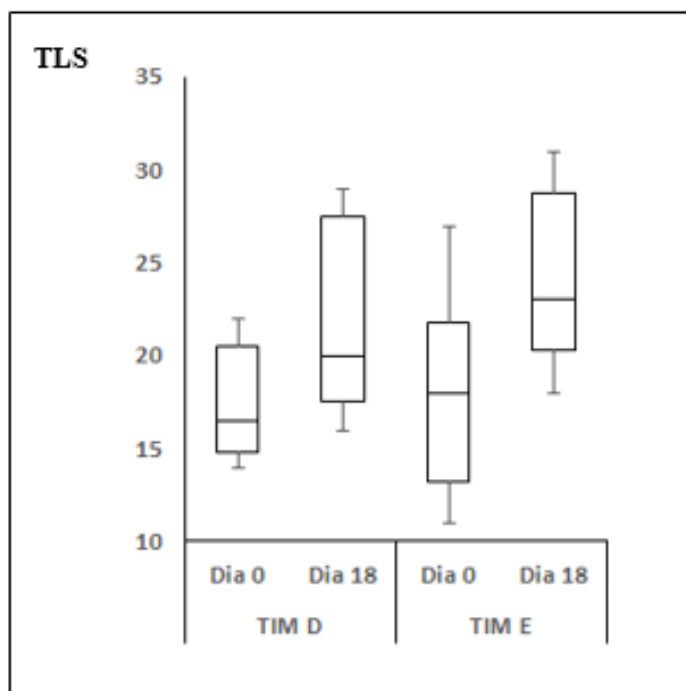


Figura 11: médias dos valores do TLS1 dos olhos direitos (D) e esquerdos (E) dos cães do grupo do timolol (TIM) obtidos no dia 0 e 18.

Como existem poucos estudos correlacionando o timolol com a produção lacrimal dos olhos de cães, não é possível desconsiderar esses valores estatísticos em que o percentual de vezes que essa elevação no TLS1 pode ser vista em cães tratados a curto prazo com tal droga chega a 62,25% ($r^2=0,6225$). Porém, essa elevação mostrada neste trabalho e os resultados de TLS1 sem variações estatísticas após a instilação dessa mesma droga em cães normotensos, 2 vezes ao dia, por 8 semanas, também foram observados por outros pesquisadores em tratamentos de curta duração (ROBINSON et al., 2013). A longo prazo, como foi o caso dos cães glaucomatosos tratados por 12 meses (KUNER et al., 2013), talvez essa droga possa

realmente interferir na produção do filme lacrimal; merecendo, assim, grande atenção na sua prescrição principalmente em se tratando de animais portadores de ceratoconjuntivite seca.

Ainda comparando os resultados obtidos entre olhos direito e esquerdo de cada grupo, é possível observar que no final do tratamento do grupo do captopril (dia 18) houve um aumento significativo ($p=0,0453$) dos valores de TLS1 (Figura 12). Esse é um dado estatístico que pode ser visto em 59,21% ($r^2=0,5921$) dos casos de olhos tratados com essa droga, o que requer atenção especial pois não existe referência na literatura quanto à produção lacrimal de cães tratados com colírio de captopril e, talvez, essa dever-se-á uma droga de escolha para cães glaucomatosos portadores de ceratoconjuntivite seca.

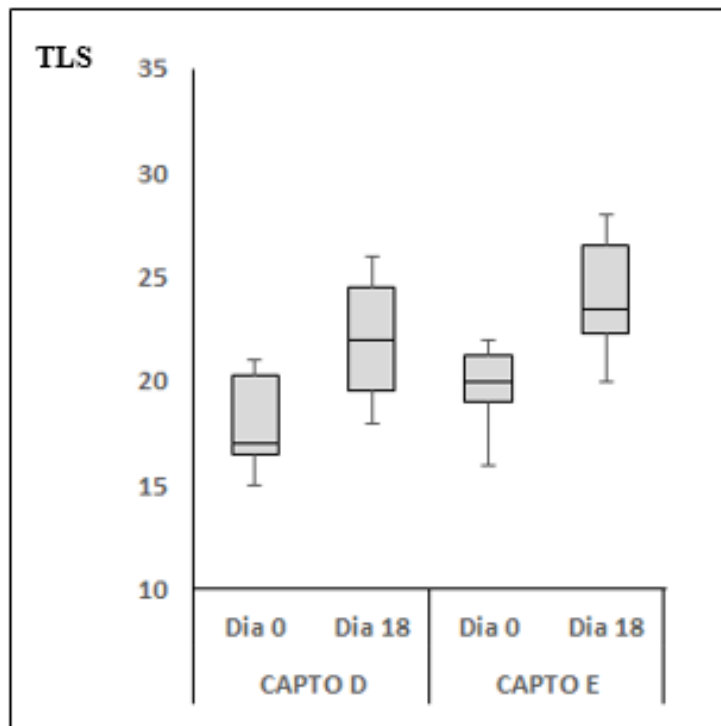


Figura 121: médias dos valores do TLS1 dos olhos direitos e esquerdos dos cães do grupo do captopril, obtidos no dia 0 e 18.

Com relação ao comparativo entre os valores de TLS1 entre olhos direito e esquerdo do grupo do DIZE, embora seja notório o aumento destes valores, o mesmo não demonstrou valor estatístico significativo (Figura 13). Isso é perfeitamente explicado, uma vez que os olhos esquerdos estão recebendo um veículo aquoso duas vezes ao dia durante os 14 dias de experimento, o que somará com a produção lacrimal individual normal e obviamente dará um valor maior do que no primeiro dia do experimento em que nada estava sendo instilado nestes olhos. Em contrapartida, a existência da produção lacrimal reflexa não deve ser esquecida (SLATTER, 2004), a qual explica também a elevação, mesmo que não estatisticamente significativa, dos valores de TLS1 nos olhos direitos.

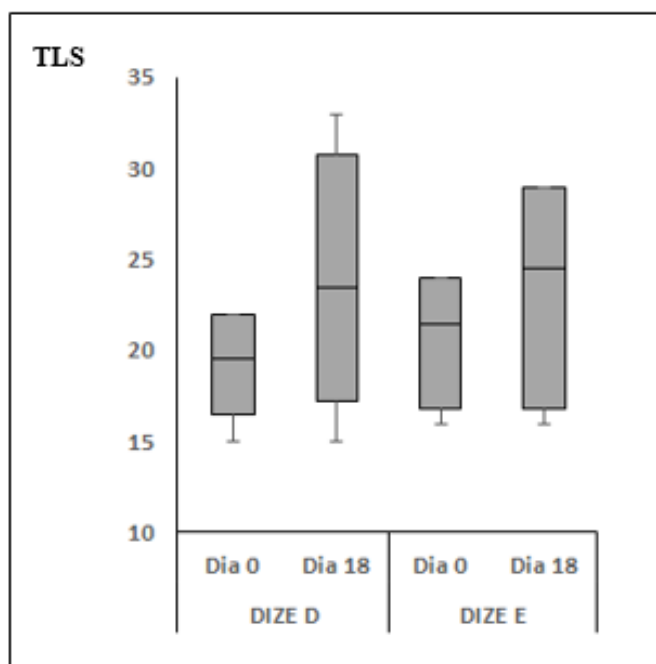


Figura 13: médias dos valores do TLS1 dos olhos direitos e esquerdos dos cães do grupo do DIZE, obtidos no dia 0 e 18.

Dessa forma, o DIZE foi a única droga que não alterou significativamente a produção lacrimal dos cães. O timolol foi o que mais elevou os valores do TLS1 quando comparamos os olhos direitos e esquerdos ($p=0,0384$; $r^2=0,6225$), seguido do captopril ($p=0,0453$, $r^2=0,5921$), porém não deve ser esquecida a tendência do primeiro, a longo prazo, causar uma diminuição nos valores do TLS1 e, portanto, agravar os casos de pacientes portadores de ceratoconjuntivite seca.

5.4 Avaliação da FC

Os valores de média e desvio padrão das FC obtidos nos 3 primeiros dias referidos como controle, nos 7 dias com as concentrações do timolol 0,5%, captopril 0,1% e dize 0,1% e nos últimos 7 dias com as concentrações do timolol 0,5%, captopril 0,5% e dize 0,5% estão representados no quadro abaixo (Quadro 5).

Quadro 5: médias e desvio-padrão dos valores de FC obtidos entre os intervalos de dias: 1-3 dias (controle), 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados respectivamente com: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC).

| FC | Timolol (GA) | | | Captopril (GB) | | | DIZE (GC) | | |
|----------------------|--------------|-------|--------|----------------|-------|--------|-----------|--------|--------|
| | 1-3d | 4-10d | 11-17d | 1-3d | 4-10d | 11-17d | 1-3d | 4-10d | 11-17d |
| Animais | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Média | 105,0 | 104,0 | 106,0 | 123,0 | 127,0 | 116,33 | 115,33 | 122,67 | 120,33 |
| Desvio Padrão | 8,17 | 5,05 | 6,57 | 10,86 | 7,97 | 13,29 | 7,0 | 3,26 | 5,12 |

Embora nos estudos com pacientes humanos (PRATT et al., 2015), o timolol tópico cause efeitos adversos como bradicardia; neste experimento foi observado que os valores de FC do grupo tratado com timolol não demonstraram diferença estatística, ou seja, o timolol não causou bradicardia nestes cães (Figura 14).

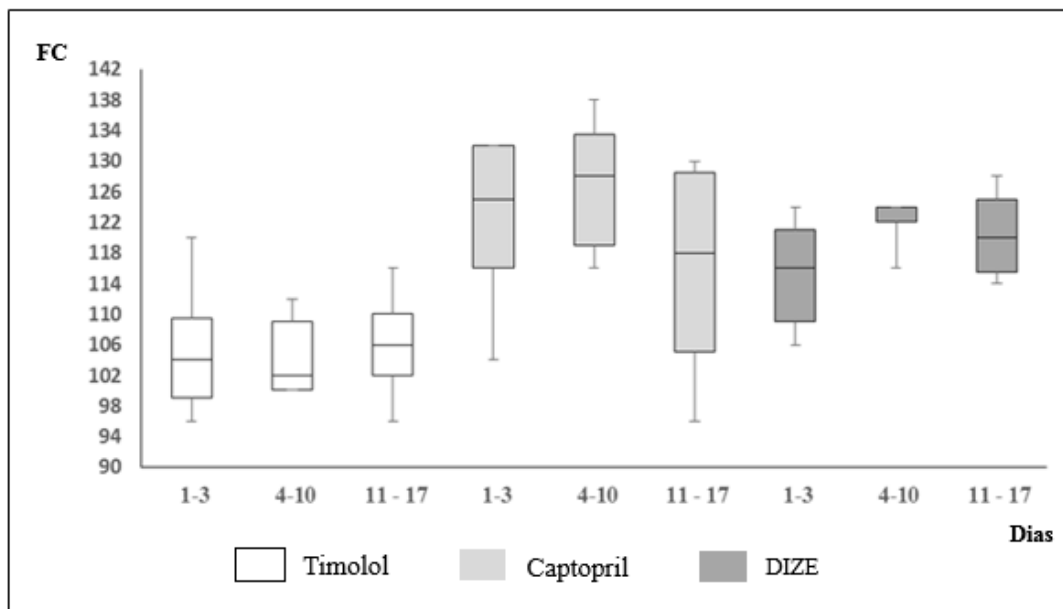


Figura 14: médias dos valores de FC dos cães dos grupos timolol, captopril e DIZE, respectivamente; obtidos nos dias 1-3 (controle), 4-10 (tratamento com menor concentração das drogas) e 11-17 (tratamento com alta concentração das drogas).

No estudo realizado no Japão, com 6 cães, não portadores de glaucoma, da raça Beagle, nenhum teve alteração significativa da FC após terem seus olhos tratados com timolol 0,5%, uma vez ao dia, durante 7 dias (TAKIYAMA, 2006), assim como o observado neste estudo. Numa outra pesquisa realizada nos EUA, os 5 cães normotensos, da raça Beagle, que foram submetidos à instilação dessa mesma droga 2 vezes ao dia, sofreram uma queda na FC durante os 4 dias iniciais do tratamento e, em seguida, a FC voltou a subir equiparando aos valores iniciais (ABRAMS et al., 1991).

Em contrapartida, existem autores que relatam o efeito colateral de bradicardia (-11.9 ± 2.0 bpm) em cães glaucomatosos tratados topicamente com timolol 0,5% (PLUMMER et al., 2006) assim como ocorre em humanos. Como existem poucos estudos com relação aos efeitos sistêmicos após o uso tópico do timolol nos olhos dos cães e, aqueles realizados em cães glaucomatosos mostraram presença de bradicardia se contrapondo aos achados em cães normotensos; não se deve descartar a ocorrência desse efeito colateral após o uso do timolol em animais portadores dessa patologia ocular.

O uso tópico do captopril 0,1% não alterou significativamente a FC dos cães, mas o captopril 0,5% reduziu ($p=0,0068$; $r^2=0,8360$), quando comparado com os valores do captopril 0,1%. Como o único estudo realizado com 6 cães normotensos da raça Beagle, os quais tiveram seus olhos tratados com SCH 33861 a 0,1% (um inibidor de ECA produzido pela Schering-Plough), apresentou no segundo dia uma redução na FC, seguida de uma elevação dos valores equiparando aos iniciais (ABRAMS et al., 1991); não foi possível afirmar que existam efeitos colaterais dessa droga sobre a FC quando administrada nessa concentração e por via tópica. Porém, vale ressaltar a bradicardia observada no grupo tratado com essa droga numa concentração mais elevada.

Com relação ao grupo do DIZE, não houve diferença estatística na FC dos animais tratados, embora a média dos valores obtidos no controle tenham sido menores que as obtidas nos dias de tratamento a 0,1% e 0,5%. Assim como nos estudos com o captopril tópico, também não há estudos correlacionando os efeitos do DIZE tópico sobre a FC em cães.

Comparando essas duas novas drogas que envolvem o SRAA, o captopril 0,1% e o DIZE nas concentrações de 0,1% e 0,5% são as mais recomendadas com relação a ausência de efeitos colaterais como a bradicardia em cães.

5.5 Avaliação da PAS

Os valores da PAS obtidos nos 3 primeiros dias referidos como controle, nos 7 dias com as concentrações do timolol 0,5%, captopril 0,1% e DIZE 0,1% e nos últimos 7 dias com as concentrações do timolol 0,5%, captopril 0,5% e DIZE 0,5% estão representados no quadro abaixo (Quadro 6).

Quadro 6: médias e desvio-padrão dos valores de PAS obtidos entre os intervalos de dias: 1-3 dias (controle), 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados respectivamente com: timolol 0,5% (GA), captopril 0,1 e 0,5% (GB) e DIZE 0,1 e 0,5 % (GC).

| PAS | Timolol (GA) | | | Captopril (GB) | | | DIZE (GC) | | |
|----------------------|--------------|--------|--------|----------------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| | 1-3d | 4-10d | 11-17d | 1-3d | 4-10d | 11-17d | 1-3d | 4-10d | 11-17d |
| Animais | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Média | 120,0 | 118,33 | 118,33 | 120,0 | 118,33 | 115,0 | 113,33 | 115,0 | 118,33 |
| Desvio Padrão | 6,32 | 7,52 | 4,08 | 6,32 | 4,08 | 5,47 | 8,16 | 5,47 | 7,52 |

Segundo a análise de variância das diferenças entre as médias, considerando um nível de significância de 5 % ou 10%, não houve diferença estatística entre os grupos ou entre as variáveis dentro de cada grupo (Figura 15). Esses resultados corroboram com os obtidos por Foureaux e colaboradores (2013) quando utilizaram o DIZE por via tópica e sistêmica em grupos distintos de ratos e nenhuma alteração foi observada nas PAS destes animais. Portanto, até o presente momento, os poucos estudos sobre o DIZE e seus efeitos sistêmicos, demonstram que tanto em ratos como em cães não há interferência dessa droga com a PAS.

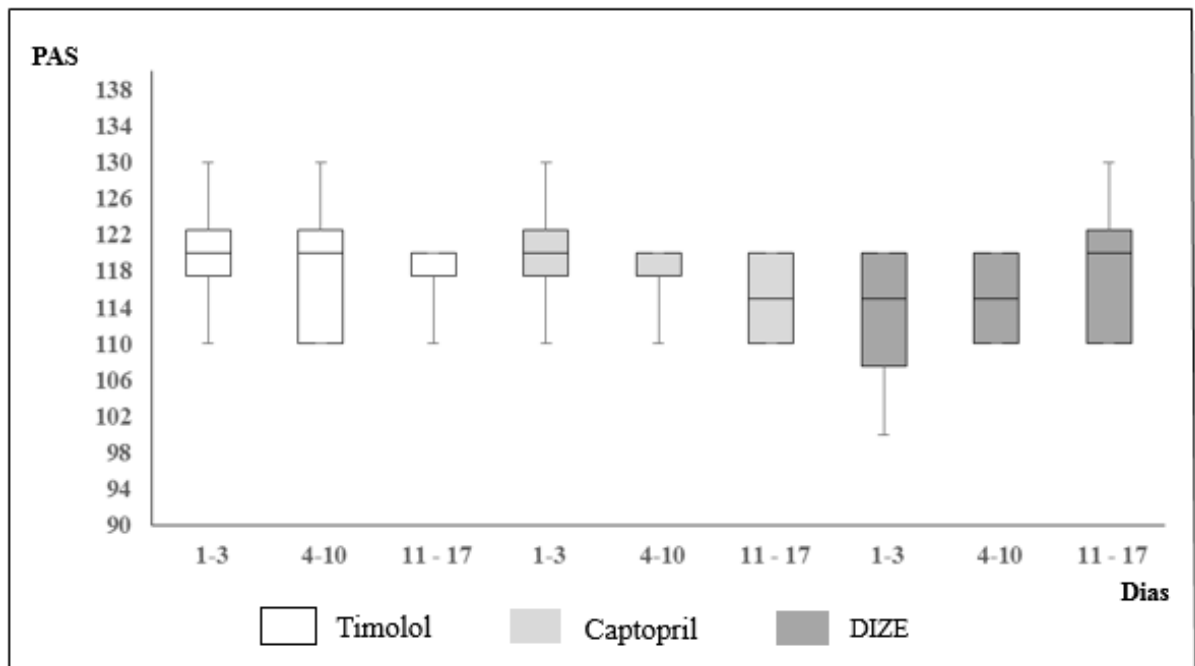


Figura 15: médias dos valores de PAS dos cães dos grupos timolol, captopril e DIZE, respectivamente; obtidos nos dias 1-3 (controle), 4-10 (tratamento com menor concentração das drogas) e 11-17 (tratamento com alta concentração das drogas).

Um único estudo realizado com SCH 33861 a 0,1% (um inibidor de ECA manipulado pela Schering-Plough) sendo instilado nos olhos de 6 cães normotensos, da raça Beagle, revelou uma redução significativa da PAS nos 5 dias de tratamento (ABRAMS et al., 1991). Embora esse resultado se contraponha com o encontrado neste experimento, não é possível descartar uma possível influência dessa droga sobre a PAS, pois são poucas as pesquisas nessa área.

Com relação ao maleato de timolol 0,5%, assim como o observado nos 5 cães normotensos da raça Beagle que foram tratados duas vezes ao dia com essa mesma droga (ABRAMS et al., 1991), não existiu interferência da droga administrada por via tópica sobre a PAS.

5.6 Avaliação da PIO

Todos os cães deste experimento (GA, GB e GC), tiveram a pressão dos seus olhos esquerdos (tratados) diminuída quando comparada à pressão dos olhos direitos (controle) em quase todos os dias e horários em que houve aferição (Figura 16).

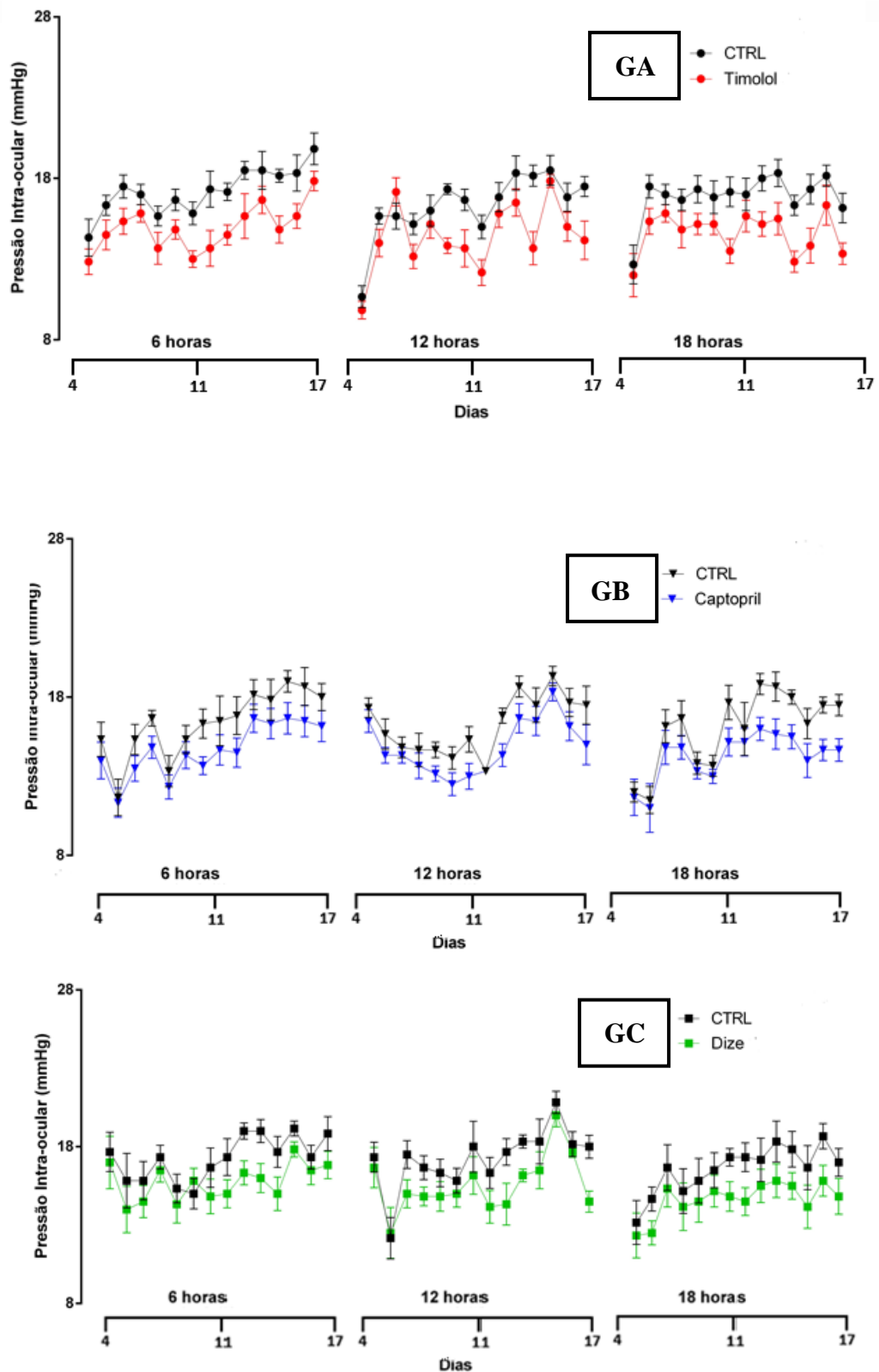


Figura 16: médias dos valores de PIO dos olhos esquerdos tratados com timolol (GA), captopril (GB) e DIZE (GC) e dos olhos adelfos usados como controle (CTRL); obtidos durante o experimento com baixa dose (4-10 dias) e alta dose (11-17 dias) nos diferentes horários (6hs, 12hs e 18hs).

Nos primeiros sete dias de tratamento com o timolol 0,5%, a média da PIO dos olhos esquerdos teve uma diminuição de 2 mmHg (Quadro 7) quando comparado com a média obtida nos olhos direitos (controle). Nos demais sete dias de tratamento com a mesma droga, a média da PIO continuou diminuindo (2,17 mmHG), demonstrando que essa droga é capaz de reduzir a PIO de cães com pressão normal, como o mostrado por Abrams e colaboradores (1991) e Takiyama e colaboradores (2006). O trabalho dos primeiros autores (1991) revelou uma diminuição da PIO em 3,0 mmHG ($p<0,01$) nos cinco cães normotensos, da raça Beagle tratados com a mesma droga e, o trabalho dos segundo autores (2006), também realizado com cães normotensos, da raça Beagle, mostrou uma redução ainda maior da PIO em 5,3 mmHg ($p<0,01$), ambos sem efeitos colaterais. Essa redução mais acentuada observada neste segundo trabalho, pode ser explicada ao observarmos o veículo oleoso usado na formulação do timolol em gel por esses autores, o qual permite uma aderência maior da droga na superfície ocular, prolongando seu efeito.

Quadro 7: médias e desvio-padrão dos valores de PIO obtidos dos olhos direitos e esquerdos entre os intervalos de 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados com timolol 0,5% (GA), seguido da diferença significativa da PIO entre OD e OE ($p<0,05$) e das percentagens de repetição desses dados (r^2).

| PIO | Timolol (GA) | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| | OD | OE | ($p<0,05$) | r^2 |
| 4-10d | 16,66 ± 1,03 | 14,66 ± 1,63 | 0,0002 | 0,9707 |
| 11-17d | 17,33 ± 0,51 | 15,16 ± 1,16 | 0,0196 | 0,7256 |

Além do observado em cães, o timolol foi capaz de reduzir a PIO em coelhos em cerca de $4,5 \pm 0,3$ mmHG (WATKINS, 1987) e em seres humanos em $10,2 \pm 2,02$ mmHg (KHAN et al., 2012). Portanto, essa é uma droga importante no tratamento do glaucoma de animais ou humanos.

Com relação aos efeitos do captopril sobre a PIO, nas diferentes concentrações utilizadas nesse estudo, foi notória a redução da mesma conforme o aumento da concentração do captopril. Nos primeiros sete dias de experimento com o captopril a 0,1%, a PIO reduziu em 1 mmHg (Quadro 8) quando os valores do olho direito (controle) foram comparados com o olho esquerdo (tratado). Nos outros sete dias de experimento com o captopril a 0,5%, a PIO reduziu em 2,5 mmHg. Essa redução também foi observada num experimento realizado com 5 cães normotensos, da raça Beagle, quando tiveram uma redução de 3 mmHg após a instilação de SCH 33861 – 0,1% (ABRAMS et al., 1991).

Quadro 8: médias e desvio-padrão dos valores de PIO obtidos dos olhos direitos e esquerdos entre os intervalos de 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados com captopril 0,1% e 0,5% respectivamente (GB), seguido da diferença significativa da PIO entre OD e OE ($p<0,05$) e das percentagens de repetição desses dados (r^2).

| PIO | Captopril (GB) | | | |
|---------------|----------------|--------------|--------------|--------|
| | OD | OE | ($p<0,05$) | r^2 |
| 4-10d | 15,0 ± 1,09 | 14,0 ± 0,63 | 0,0257 | 0,6875 |
| 11-17d | 17,83 ± 0,75 | 15,33 ± 1,03 | 0,0290 | 0,6691 |

Um estudo comparando os efeitos de diversos inibidores de ECA em coelhos normotensos, também comprovou a redução da PIO equiparável à redução ocorrida quando instilado o colírio de maleato de timolol 0,5%, sem apresentar qualquer tipo de efeito colateral

(WATKINS et al., 1987). Nesse estudo, os olhos tratados com colírio de SCH 33861 – 0,001%, um inibidor de ECA não-sulfidrido produzido pela Schering-Plough, reduziu a PIO em $4,8 \pm 0,5$ mmHg; o colírio de captopril 0,1% reduziu em $4,0 \pm 0,4$ mmHg, o colírio de enalapril reduziu em $4,7 \pm 0,4$ mmHg e o timolol 0,5%, em $4,5 \pm 0,3$ mmHg.

Uma redução mais acentuada foi observada em coelhos induzidos ao glaucoma com glicose 5% por via intravenosa, quando foi comparada a ação dos colírios de perindopril 1% e pilocarpina 1% (MEHTA et al., 2010). Nesse estudo, a PIO dos olhos tratados com a primeira droga, sofreu uma redução de $35 \pm 1,38$ mmHg para $22,45 \pm 1,42$ mmHg e, os tratados com a segunda droga tiveram uma redução de $34,4 \pm 0,81$ mmHg para $20,15 \pm 0,69$ mmHg. Isso comprova que os inibidores de ECA são potentes redutores da PIO, principalmente quando administrados em olhos glaucomatosos.

O estudo realizado com o DIZE também revelou uma marcada redução da PIO de 1,5 mmHg nos olhos dos cães tratados topicamente com a concentração de 0,1% e de 1,67 mmHg nos tratados com 0,5% (Quadro 9).

Quadro 9: médias e desvio-padrão dos valores de PIO obtidos dos olhos direitos e esquerdos entre os intervalos de 4-10 dias e 11-17 dias, dos grupos de cães tratados com DIZE 0,1% e 0,5% respectivamente (GC), seguido da diferença significativa da PIO entre OD e OE ($p < 0,05$) e das percentagens de repetição desses dados (r^2).

| PIO | DIZE (GC) | | | |
|---------------|------------------|------------------|----------------|--------|
| | OD | OE | ($p < 0,05$) | r^2 |
| 4-10d | $16,33 \pm 2,33$ | $14,83 \pm 2,31$ | 0,0011 | 0,9318 |
| 11-17d | $18,0 \pm 1,54$ | $16,33 \pm 0,81$ | 0,0612 | 0,5312 |

Diferentemente do ocorrido em nosso estudo com o DIZE tópico em cães (único na literatura até o presente momento), as administrações tópicas de angiotensina (1-7), um agonista de receptor Mas, em olhos de coelhos normotensos não reduziram a PIO. Em contrapartida, a administração intravítrea de 50 μ L dessa mesma droga nos olhos de coelhos normotensos, foi capaz de reduzir significativamente ($p=0,008$) a PIO (VAAJANEN et al., 2014) (Anexo D). Nesse mesmo estudo, os autores aplicaram 50 μ L de angiotensina (1-7) intravítrea em outro grupo de coelhos normotensos e, em seguida, administraram A-779, um antagonista do receptor Mas, para avaliar o eixo ECA2/Ang (1-7)/receptor Mas. Com isto, eles puderam comprovar que o efeito hipotensor da Ang (1-7) foi bloqueado pela A-779.

Embora em olhos normotensos de coelhos a Ang (1-7) seja capaz de reduzir a PIO, o mesmo não ocorre quando analisamos o eixo SRAA em olhos normotensos de ratos. Qualquer que seja a via de administração nessa espécie, não se observa a redução da PIO. Tal discrepância entre olhos normotensos de ratos e coelhos, segundo estes autores, dever-se-á a evolução das espécies (FOUREAUX et al., 2015).

Entretanto, nesse mesmo estudo de Foureaux e colaboradores, quando causaram glaucoma nos olhos de ratos e, em seguida, trataram um grupo desses animais com DIZE sistêmico e outro grupo com DIZE tópico, eles observaram uma redução da PIO de $27,9 \pm 7,0$ mmHg para $11,2 \pm 4,6$ mmHg e de $27,1 \pm 5,0$ mmHg para $8,7 \pm 1,1$ mmHg respectivamente (Anexo E).

Ainda no experimento de Foureaux e colaboradores, quando causaram glaucoma em um outro grupo de ratos e, uma semana depois do glaucoma instalado, iniciaram o tratamento tópico simultâneo de DIZE (1 mg/Kg) e A-779 (120 μ g/d), um antagonista da Ang (1-7); eles comprovaram que o A-779 foi capaz de bloquear totalmente o efeito hipotensor do DIZE

sobre a PIO (Anexo F). Dessa forma, foi sugerido que a ativação intrínseca de ECA2 aumenta a produção de Ang (1-7), a qual age no receptor Mas causando redução na PIO.

Tomando como base os experimentos referidos acima (VAAJANEN et al., 2014; FOUREAUX et al., 2015), é possível compreender a redução da PIO dos olhos normotensos dos cães deste experimento em questão, como uma ação do DIZE ativando a produção de ECA2 que consequentemente aumenta a produção de Ang (1-7), a qual age sobre o receptor Mas reduzindo a PIO. Ainda seguindo a linha de pesquisa dos mesmos, numa linha evolutiva das espécies, os olhos de ratos normotensos não sofrem a ação dessas drogas do eixo SRAA, mas os olhos de coelhos e cães normotensos, demonstraram a ação dessas drogas no eixo Ang (1-7)/receptor Mas. Entretanto, em se tratando de olhos glaucomatosos, independentemente da espécie, há ação dessas drogas no eixo, reduzindo a PIO; o que comprova o anteriormente dito por Vaajanen e colaboradores (2014):

“O SRAA local é mais fortemente ativado em situações fisiopatológicas, tais como no glaucoma, quando observamos a redução da PIO de maneira mais eficiente”.

5.7 Avaliação do Diâmetro Pupilar

Os diâmetros pupilares de todos os animais foram avaliados quanto à miose, midríase e normalidade, três vezes ao dia, durante todo o experimento. Em se tratando de dados não-paramétricos, ou seja, dados que não seguem uma normalidade, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual confirmou que os diâmetros pupilares dos animais pertencentes a cada grupo, não sofreram variações significativas (Figura 17). Esse dado com relação ao grupo do timolol (única droga com dados científicos registrados quanto a essa variável), se contrapõe com os relatados por outros pesquisadores (ROBINSON et al., 2013; TAKIYAMA et al., 2006), os quais mostraram a presença de miose em cães, normotensos e glaucomatosos, tratados com timolol tópico. Por se tratar de uma análise subjetiva, mais estudos dever-se-ão realizar para melhor analisar tal variável.

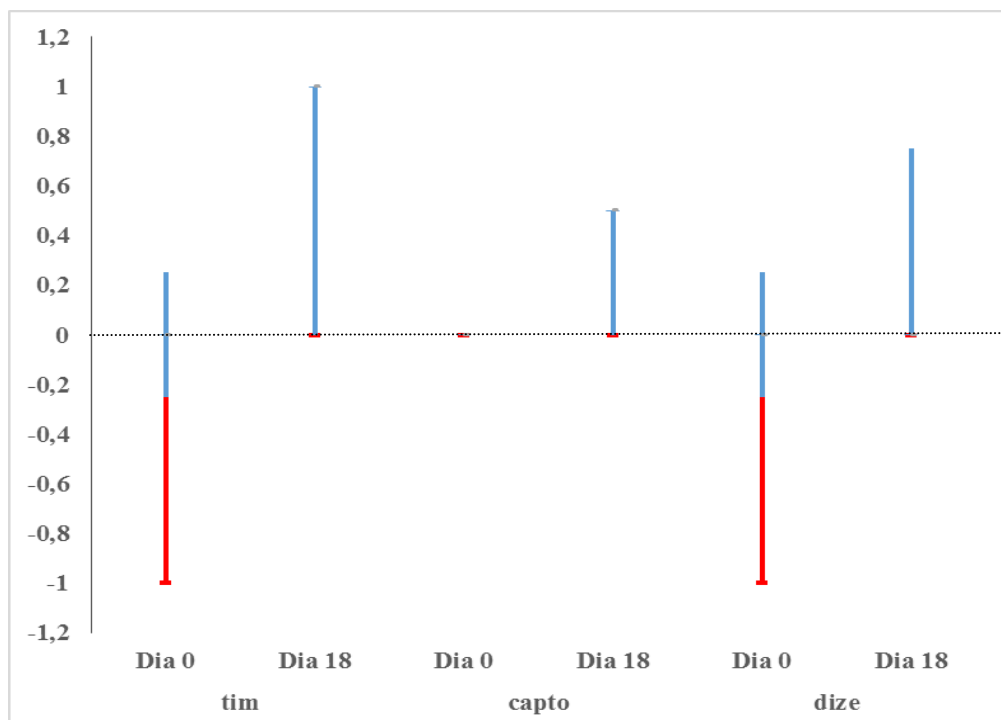


Figura 17: médias dos valores representados de diâmetro pupilar (-1=mirose, 0=normal, +1=midríase) dos olhos tratados com timolol, captopril e DIZE, nos dias 0 e 18, mostrando os valores máximos e mínimos obtidos.

Quando são comparadas as variáveis de concentrações entre os diferentes grupos de tratamento, alguns diâmetros variaram estatisticamente. Neste caso, o captopril 0,1% e o dize 0,1% diferiram significativamente ($p=0,0043$) demonstrando que o primeiro manteve o diâmetro pupilar dentro da normalidade, mas o segundo, tendeu a causar midríase quando tiveram seus dados comparados. O captopril 0,1% também diferiu do timolol ($p=0,0056$), quando o primeiro tendeu a normalidade do diâmetro pupilar e o segundo tendeu à midríase quando comparados. Portanto, comparando as diferentes concentrações entre os diferentes grupos, o captopril 0,1% foi o que menos alterou o diâmetro pupilar, mantendo, assim, as pupilas próximas dos seus diâmetros iniciais normais.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos com a pesquisa, conclui-se que:

- 1- Os colírios de captopril e DIZE formulados em diferentes concentrações e administrados pela primeira vez na superfície ocular de cães possuíram boa penetrabilidade e não apresentaram efeitos colaterais a nível oftalmológico.
- 2- Quanto à produção lacrimal, o DIZE foi a única droga que não alterou o TLS; sendo o captopril mais indicado para os portadores de ceratoconjuntivite seca e o timolol contra-indicado para os portadores desta patologia ocular.
- 3- Todas as drogas diminuíram os valores da PIO, sendo que na segunda semana de tratamento, com concentrações maiores, as reduções foram mais acentuadas.
- 4- A FC não sofreu alteração nos tratamentos com timolol 0,5%, DIZE 0,1% e 0,5% e captopril 0,1%, mas houve bradicardia nos animais tratados com captopril 0,5%.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como não existem estudos avaliando os efeitos do acetato de diminazeno (DIZE) em cães portadores de glaucoma, preconizam-se pesquisas que permitam elucidar os efeitos benéficos dessa droga com relação à redução da PIO sem efeitos colaterais a nível ocular e sistêmico, como os observados no trabalho em questão com cães normotensos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, K.L. Medical and surgical management of the glaucoma patient. **Clinical Technical Small Animal Practice**, v.16, p.71-76, 2001.

ABRAMS, K.L.; BROOKS, D.E.; LARATTA, L.J.; BARNHILL, M.A.; FRAZIER, D. Angiotensin converting enzyme system in the normal canine eye: pharmacological and physiological aspects. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.1, p. 41-51, 1991.

ADAMS, H.R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara&Koogan, 2001. 1034 p.

AGUILERA, G; KISS A. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and vasopressin secretion. Role of angiotensin II. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.396, p.105–12, 1996.

BATISTUZZO, J.A.O.; ETO, Y.; ITAYA, M. **Formulário Médico Farmacêutico**. 4 ed. Editora Pharmabooks, 2011. 65-76p.

BERKA, J.L.; STUBBS, A.J.; WANG, D.Z. Renin-containing Müller cells of the retina display endocrine features. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.36, p.1450–1458, 1995.

BONOMI, L.; ZAVARISE, G.; NOYA, E.; MICHIELETTO, S. Effects of timolol maleate on tear flow in human eyes. **Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol**. v.1, p.19-22, 1980.

BOROVIC, D.; BENDELIC, E.; CHISELIȚĂ, D. Study of kini-kallikrein and renin-angiotensin systems in patients with primary open angle glaucoma. **Oftalmologia**, v.53, n.2, p.61-68, 2009.

BROOKS, D.E.; GARCIA, G.A.; DREYER, E.B.; ZURAKOWSKI, D.; FRANCO-BOURLAND, R.E. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.864-867, 1997.

CABRAL, R.R.; CIASCA, B.D.; OLIVEIRA, V.M.C.; VAZ-CURADO, A.P.; LARSSON, M.H.M.A. Valores da pressão arterial em cães pelos métodos oscilométrico e Doppler vascular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, 2010.

CHIOU, H.J. et al. Evaluation of ocular arterial changes in glaucoma with color Doppler ultrasonography. **Journal Ultrasound in Medicine**, v.18, p.295-302, 1999.

CONSTAD, W.H.; FIORE, P.; SAMSON, C.; CINOTTI, A.A. Use of an angiotensin converting enzyme inhibitor in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. **American Journal of Ophthalmology**, v.105, p.674-677, 1988.

CRAWFORD, K.; KAUFMAN, P.L. Pilocarpine antagonizes prostaglandin F_{2α}-induced ocular hypotension in monkeys. Evidence for enhancement of Uveoscleral outflow by prostaglandin F_{2α}. **Archives of ophthalmology**, v.105, p.1112–1116, 1987.

CULMAN, J.; HOHLE, S.; QADRI, F.; EDLING, O.; BLUME, A.; LEBRUN, C.; UNGER, T. Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.17, p.281–293, 1995.

CUNHA-VAZ, J. The blood-ocular barriers. **Survey of Ophthalmology**, v.23, p.279–296, 1979.

CUNHA-VAZ, J.G. The blood-retinal barrier system. Basic concepts and clinical evaluation. **Experimental Eye Research**, v.78, p.715-721, 2004.

DANSER, A.H.J.; DERKX, F.H.M.; ADMIRAAL, P.J.J.; DEINUM, J.; DE JONG, P.T.V.M.; SCHALEKAMP, M.A.D.H. Angiotensin levels in the eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.35, p.:1008–1018, 1994.

DE GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T. International union of pharmacology XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacology Reviews**, v.52, p.415-472, 2000.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Elsevier Brasil, 2004. 813 p.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R.E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzymereLATED carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation research**. v.87, p.1-9, 2000.

FELDMAN, R.M. Conjunctival hyperemia and the use of topical prostaglandins in glaucoma and ocular hypertension. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, New York, v.19, n.1, p.23-31, 2003.

FOUREAUX, G.; NOGUEIRA, J.C.; NOGUEIRA, B.S.; FULGÊNCIO, G.O.; MENEZES, G.B.; FERNANDES, S.O.; CARDOSO, V.N.; FERNANDES, R.S.; OLIVEIRA, G.P.; FRANCA, J.R.; FARACO, A.A.; RAIZADA, M.K.; FERREIRA, A.J. Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.6, p.4296-4306, 2015.

GELATT, K.N.; BROOKS, D.E. The canine glaucomas. In:_____. **Veterinary ophthalmology**. 3.ed. Malvern: Lea & Febiger, cap.21, p.701-754, 1999.

GIESE, M.J.; SPETH, R.C. The ocular renin–angiotensin system: A therapeutic target for the treatment of ocular disease. **Pharmacology & Therapeutics**. p.1-22, 2013.

GIONFRIDDO, J.R. Recognizing and managing acute and chronic cases of glaucoma. **Veterinary Medicine**, v.90, p.265-275, 1995.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 2112 p.

GYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiología Médica**. 10 ed. McGraw-Hill Interamericana de España, 2001. 695-699 p.

HAKANSON, N.; DRU FORRESTER, S. Uveitis in the dog and cat. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.20, n.3, p.715-735, 1990.

HIROOKA, K.; SHIRAGA, F. Potential role for angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of glaucoma. **Clinical Ophthalmology**. v.3, p. 217–223, 2007.

HOY, Y.; DELAMERE, N.A. Influence of ANG II on cytoplasmic sodium in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.283, p.552–559, 2002.

IUSUF, D.; HENNING, R.H.; VAN GILST, W.H.; ROKS, A.J. Angiotensin-(1-7): Pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. **European Journal of Pharmacology**. v.13, p.303-312, 2008.

ITO, M.; OLIVERIO, M.I.; MANNON, P.J. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.3521–3525, 1995.

JACKSON, K.E. Renin and Angiotensin. **In: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. New York: Medical Publishing Division, 2006. 789-814p.

JEGOU, J.P. Lês glaucomes. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.165, p.263-278, 1989.

KAZUYUKI, H.; FUMIO, S. Potential role for angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of glaucoma. **Clinical Ophthalmology**, v.3, p.217-223, 2007.

KHAN, N.; KHALEQUE, M.A.; ISLAM, M.S.; BEGUM, R.A.; UDDIN, M.S.; HOSSAIN, M.M.; ALI M. Effect of topical Beta blocker (Timolol maleate 0.5%) in primary open angle glaucoma. **Mymensingh Medical Journal**, v.4, p.648-653, 2012.

KOSTENIS, E.; MILLIGAN, G.; CHRISTOPOULOS, A.; SANCHEZ-FERRER, C.F.; HERINGER-WALTHER, S.; SEXTON, P.M.; GEMBARDT, F.; KELLETT, E.; MARTINI, L.; VANDERHEYDEN, P.; SCHULTHEISS, H.P.; WALTHER, T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation**, v.14, p.1806-1813, 2005.

KUNER, A.; VIEIRA, J.B.; CAVALCANTI, P.D.C.; FALEIRO, R.D. Retrospective study (2010-2013) of the incidence of keratoconjunctivitis sicca (KCS) in dogs with glaucoma. **Veterinary Ophthalmology**, v.16, p.4121-425, 2013.

KWON, Y.H.; CAPRIOLI, J. Primary open angle glaucoma. **In: Duane`s Ophthalmology.** CD-ROM ed. Lippincot Williams et Wilkins, 2006, v.3, 45p.

LEMOES, V.S.; SILVA, D.M.; WALTHER, T.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R.A. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of maskknockout mice. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, p. 274-279, 2005.

LUHTALA, S.; VAAJANEN, A.; OKSALA, O.; VALJAKKA, J.; VAPAATALO, H. Activities of angiotensin-converting enzymes ACE1 and ACE2 and inhibition by bioactive peptides in porcine ocular tissues. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.25, n.1, p.23-28, 2009.

MALEATO DE TIMOLOL. Responsável técnico Elizabeth Mesquita. São Paulo: Allergan Produtos Farmacêuticos LTDA, 2013. Bula de remédio.

MARTINS, B.C.; VICENTI, F.A.M.; LAUS, J.L. Síndrome glaucomatosa em cães – Parte 1. **Ciência Rural**, v.36, n.6, 2006.

MEHTA, A.; IYER, L.; PARMAR, S.; SHAH, G.; GOYAL, R. Oculohypotensive effect of perindopril in acute and chronic models of glaucoma in rabbits. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.88, n.5, p.595-600, 2010.

MITCHELL, P.; LEE, A.J.; ROCHTCINA, E.; WANG, J.J. Open-angle glaucoma and systemic hypertension: The Blue Mountains Eye Study. **Journal Glaucoma**, v.13, p.319-326, 2004.

MUÑOZ-NEGRETE, F.J.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; WON KIM, H.R.; REBOLLEDA, G. Nuevos desarrollos en el tratamiento médico del glaucoma. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, n.10, v.84, p.491-500, 2009.

NASKAR, R.; DREYER, E. New horizons in neuroprotection. **Survey of Ophthalmology**, v.5, supl.3, p.S250-S255, 2001.

ORÍ, A. P. Considerations about electroretinography in dogs. **Ciência Rural**, v. 34, p. 323-328, 2004.

PLUMMER, C.E.; MACKAY, E.O.; GELATT, K.N. Comparison of the effects of topical administration of a fixed combination of dorzolamide-timolol to monotherapy with timolol or dorzolamide on IOP, pupil size, and heart rate in glaucomatous dogs. **Veterinary Ophthalmology**. v.9, n.4, p.245-249, 2006.

PRATT, N.L.; RAMSAY, E.N.; ELLETT, L.M.K.; NGUYEN, T.A.; ROUGHEAD, E.E. Association between Ophthalmic Timolol and Hospitalisation for Bradycardia. **Journal of Ophthalmology**, p.387-393, 2015.

QUIROZ Mercado, Joaquín, Curso De Actualización En Oftalmología Em Perros Y Gatos, **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, México, 2007.

- RAMIREZ, M.; DAVIDSON, E.A.; LUTTENAUER, L.; ELENA, P.P.; CUMIN, F.; MATHIS, G.A.; DE GASPARO, M. The renin-angiotensin system in the rabbit eye. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.12, n.3, p.299-312, 1996.
- REINSTEIN, S.L.; RANKIN, A.J.; ALLBAUGH, R. Canine glaucoma: pathophysiology and diagnosis. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*. v.31, n.10, p.450-452, 2009.
- RIBEIRO, A.P.; MARTINS, B.C.; LAUS, J.L. Síndrome glaucomatosa em cães – parte 2. **Ciência Rural**, v.37, n.6, 2007.
- ROBINSON, C.C.; ALLBAUGH, R.A.; RAMIREZ, A.; JEANS, J.K.; WHITLEY, R.D.; BEN-SHLOMO, G.; ELLINWOOD, N.M. The effect of topical 0,5% timolol maleate ophthalmic solution on canine tears. **Veterinary Ophthalmology**, v.16, p.413-416, 2013.
- SAGARA, T.; GATON, D.D.; LINDSEY, J.D.; GABELT, B.T.; KAUFMAN, P.L.; WEINREB, R.N. Topical prostaglandin F₂alpha treatment reduces collagen types I,II,III and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v.117, n.6, p.794-801, 1999.
- SANTOS, R.A.; SIMOES E SILVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.; MACHADO, R.P.; DE BUHR, I. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G-protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.8, p.8258-8263, 2003.
- SLATTER, D. Glaucoma. In:_____. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 2.ed. Philadelphia:Saunders, p.338-364, 1990.
- SLATTER, D. Fundamentos De Oftalmología Veterinaria, 3ª Edición, Editorial. **Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina**, p. 390-450, 2004.
- SLATTER, D. Tratado de Cirugía en pequeños animales, Tercera Edición, Tomo 2, **Editorial Inter-Médica, Argentina**, p. 1671-1697, 2005.
- SOLTAU, J.B.; ZIMMERMAN, T.J. Changing paradigms in the medical treatment of glaucoma. **Survey in Ophthalmology**, New York, v.47, Suppl 1, p.s2-5, 2002.
- SU, J.B. Kinins and cardiovascular diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, p.3423-3435, 2006.
- TAKIYAMA, N.; SHOJI, S.; HABATA, I.; OHBA, S. The effects of a timolol maleate gel-forming solution on normotensive Beagle dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.6, p.631-633, 2006.
- TAMBURRELLI, C. Ultrasonographic evaluation of optic disc swelling: comparison with cslo in idiopathic intracranial hypertension. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.41, p.2960–2966, 2000.

TIELSCH, J.M.; KATZ, J.; SOMMER, A.; QUIQLEY, H.A.; JAVITT, J.C. Hypertension, perfusion pressure, and primary open angle glaucoma. A population-based assessment. **Archives of Ophthalmology**. v.113, p.216-221, 1995.

TIKELLIS, C.; BERNARDI, S.; BURNS, W.C. Angiotensin-converting enzyme 2 is a key modulator of the renin-angiotensin system in cardiovascular and renal disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.1, p.62-68, 2011.

VAAJANEN, A.; VAPAATALO, H.; KAUTIAINEN, H.; OKSALA, O. Angiotensin (1-7) reduces intraocular pressure in the normotensive rabbit eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.6, p.2557-62, 2014.

VAAJANEN, A.; VAPAATALO, H. Local Ocular Renin-Angiotensin System – A target for Glaucoma Therapy? **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.109, p.217-224, 2011.

VAAJANEN, A. Expression and function of angiotensins in the regulation of intraocular pressure. **Thesis**. University of Helsinki, 2009.

VAAJANEN, A.; LUHTALA, S.; OKSALA, O.; VAPAATALO, H. Does the renin-angiotensin system also regulate intra-ocular pressure? **Annals of Medicine**, v.40, p.418–427, 2008.

VICKERS, C.; HALES, P.; KAUSHIK, V.; DICK, L.; GAVIN, J.; TANG, J.; GODBOUT, K.; PARSONS, T.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; ACTON, S.; PATANE, M.; NICHOLS, A.; TUMMINO, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **Journal of Biology Chemistry**. v.277, p.14838-14843, 2002.

WAGNER, J.; JAN DANSER, A.H.; DERKX, F.H. Demonstration of rennin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular rennin-angiotensin system. **British Journal of Ophthalmology**, v.80, p.159–163, 1996.

WANG, R.F.; PODOS, S.M.; MITTAG, T.W.; YOKOYOMA, T. Effect of CS- 088, an angiotensin AT1 receptor antagonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes. **Experimental Eye Research**, v. 80, p.629-632, 2005.

WATKINS, R.W.; BAUM, T.; CEDENO, K.; SMITH, E.M.; YUEN, P.H.; AHN, H.S.; BARNETT, A. Topical ocular hypotensive effects of the novel angiotensin converting enzyme inhibitor SCH 33861 in conscious rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v.3, n.4, p.295-307, 1987.

WEITZMAN, M.; CAPRIOLI, J. Medical Therapy of glaucoma. In: Tasman W, Jaeger EA (eds). **Duanes's Ophthalmology on CD-ROM**. v.3, Chapter 56. Pippincot Williams et Wilkins. Philadelphia, 2006.

WHITEMAN, A.L. ; KLAUSS, G.; MILLER, P.E.; DUBIELZIG, R.R. Morphologic features of degeneration and cell death in the neurosensory retina in dogs with primary angle-closure glaucoma. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.257-261, 2002.

WILKIE, D.A. Glaucoma. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders – clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, p.1360-1366, 1998.

WILLIS, A.M. Ocular hypotensive drugs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.34, n.3, p.755-76, 2004.

WOOD, J.L.N.; LAKHANI, K.H.; MASON, I.K.; BARNETT, K.C. Relationship of the degree of goniodysgenesis and other ocular measurements to glaucoma in great danes. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.1493–1499, 2001.

9 ANEXOS

ANEXO A

Tabela A: efeito de algumas drogas antiglaucomatosas na pressão intra-ocular, na produção e drenagem do humor aquoso (WETZMAN & CAPRIOLI, 2006)

| Compound | IOP (%) | Aqueous production (%) | Aqueous out-flow (%) |
|--------------------------------------|---------|------------------------|----------------------|
| Non-selective β -blocker | ↓ 20-30 | ↓ 35 | |
| β 1-selective β -blocker | ↓ 15-25 | ↓ 25 | |
| Direct miotic | ↓ 15-25 | | ↑ 25 |
| Non-selective adrenergic agonist | ↓ 15-25 | | ↑ |
| α 2-agonist | ↓ 20-30 | ↓ 35 | ? |
| Carbonic anhydrase inhibitor | ↓ 20-35 | ↓ 35 | |
| Prostaglandin analogue | ↓ 25-35 | | ↑ 100 |

IOP, intraocular pressure.

ANEXO B

Tabela B: localização dos componentes do SRA nos tecidos oculares de diferentes espécies (VAAJANEN, 2009).

| RAS molecule | Eye part | Species | References |
|------------------------|---------------|----------------------------|--------------------------------------|
| Prorenin | Retina | Human | Sramek <i>et al.</i> , 1988 [18] |
| | Ciliary body | Human | Danser <i>et al.</i> , 1989 [19] |
| | Vitreous body | Human | |
| Renin | Retina | Human, rabbit | Danser <i>et al.</i> , 1989 [19] |
| | Ciliary body | Rabbit | Wagner <i>et al.</i> , 1996 [20] |
| | Choroid | Human, rabbit | Ramirez <i>et al.</i> , 1996 [21] |
| | Iris | Rabbit | |
| | Vitreous body | Human, rabbit | |
| | AH | Rabbit | |
| Angiotensinogen | Retina | Human, rabbit | Sramek <i>et al.</i> , 1992 [22] |
| | Ciliary body | Human, rabbit | Ramirez <i>et al.</i> , 1996 [21] |
| | Choroid | Human, rabbit | Wagner <i>et al.</i> , 1996 [20] |
| | Iris | Human, rabbit | |
| | Vitreous body | Human, rabbit | |
| | AH | Rabbit | |
| ACE1 | Retina | Dog, monkey, human | Vita <i>et al.</i> , 1981 [23] |
| | | Rabbit, porcine | Weinreb <i>et al.</i> , 1985 [24] |
| | Ciliary body | Human, rabbit, porcine | Immonen <i>et al.</i> , 1987 [25] |
| | Choroid | Dog, monkey, human | Ramirez <i>et al.</i> , 1996 [21] |
| | | Rabbit, porcine | Wagner <i>et al.</i> , 1996 [20] |
| | Sclera | Dog, monkey | Shiota <i>et al.</i> , 1997 [26] |
| | Iris | Rabbit, porcine | Geng <i>et al.</i> , 2003 [27] |
| | Cornea | Human | Savaskan <i>et al.</i> , 2004 [28] |
| | Vitreous body | Dog, monkey, rabbit | |
| | AH | Human, dog, monkey, rabbit | |
| | Tear fluid | Human, rabbit | |
| ACE2 | Retina | Rodent | Tikellis <i>et al.</i> , 2004 [29] |
| | | Human | Senanayake <i>et al.</i> , 2007 [30] |
| Chymase | Choroid | Dog | Shiota <i>et al.</i> , 1997 [26] |
| | Sclera | Dog | Maruichi <i>et al.</i> , 2004 [31] |
| | Vitreous body | Human | |
| Ang II receptor type 1 | Retina | Human | Savaskan <i>et al.</i> , 2004 [28] |
| | Cornea | Human | Senanayake <i>et al.</i> , 2007 [30] |
| Ang II receptor type 2 | Retina | Human | Senanayake <i>et al.</i> , 2007 [30] |
| Ang I | Retina | Porcine | Danser <i>et al.</i> [19] [32] |
| | Choroid | Porcine | |
| | Vitreous body | Porcine, human | |
| | AH | Human | |
| | | | |
| Ang II | Retina | Human, porcine, rabbit | Danser <i>et al.</i> [19] [32] |
| | Ciliary body | Human, rabbit | Ramirez <i>et al.</i> , 1996 [21] |
| | Choroid | Porcine, human, rabbit | Savaskan <i>et al.</i> , 2004 [28] |
| | Iris | Rabbit | Senanayake <i>et al.</i> , 2007 [30] |
| | Cornea | Human | |
| | Vitreous body | Porcine, human, rabbit | |
| | AH | Human, rabbit | |
| Ang 1-7 | Retina | Human | Senanayake <i>et al.</i> , 2007 [30] |

ACE, angiotensin-converting enzyme; AH, aqueous humour; RAS, renin-angiotensin system.

ANEXO C

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).



Seropédica 10 de outubro de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 112/2014 intitulado **“Influência de fármacos no Sistema-Renina-Angiotensina-Aldosterona do globo ocular de cães: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação clínica.”** encaminhado pelo Professor (a) do Departamento Ciências Fisiológicas, Luís Carlos Reis. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 10 de outubro de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.



Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

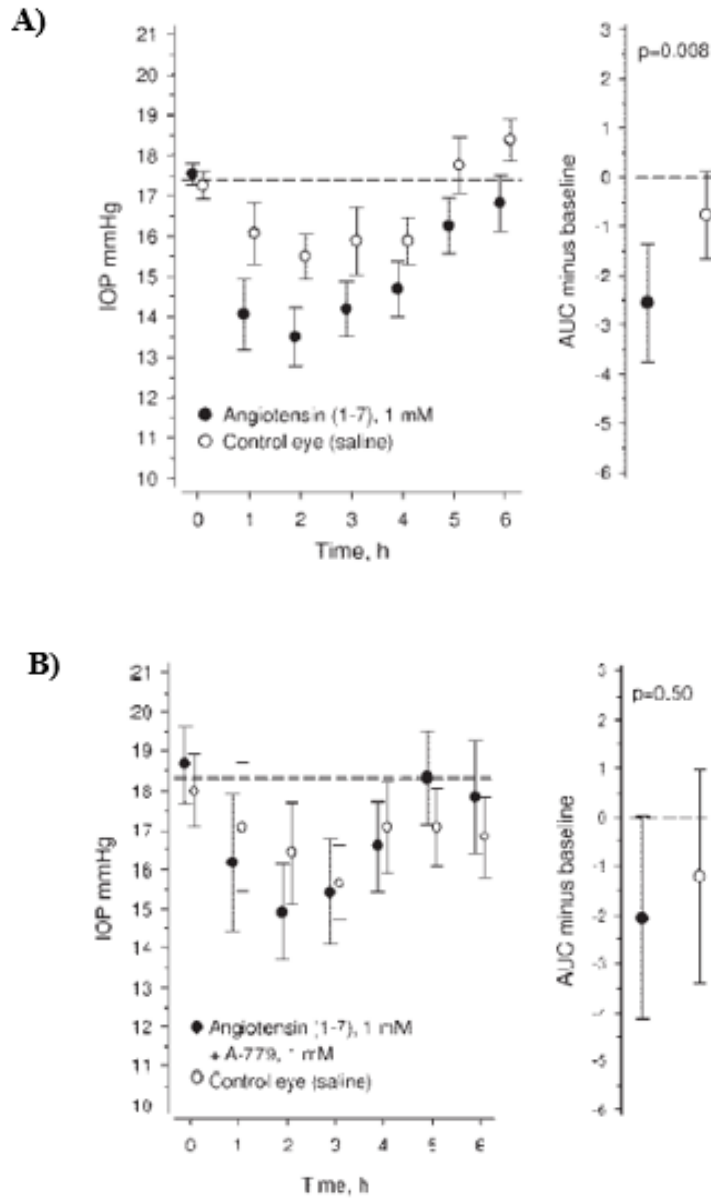


Jonimar Pereira Paiva
Vice-Cordenador CEUA-IV

BR 465, Km 7 – Campus da UFRRJ
Seropédica – Rio de Janeiro – CEP: 23.890-000
Telefone: (021) 2682-3051 E-mail: ceua.iv.ufrj@gmail.com

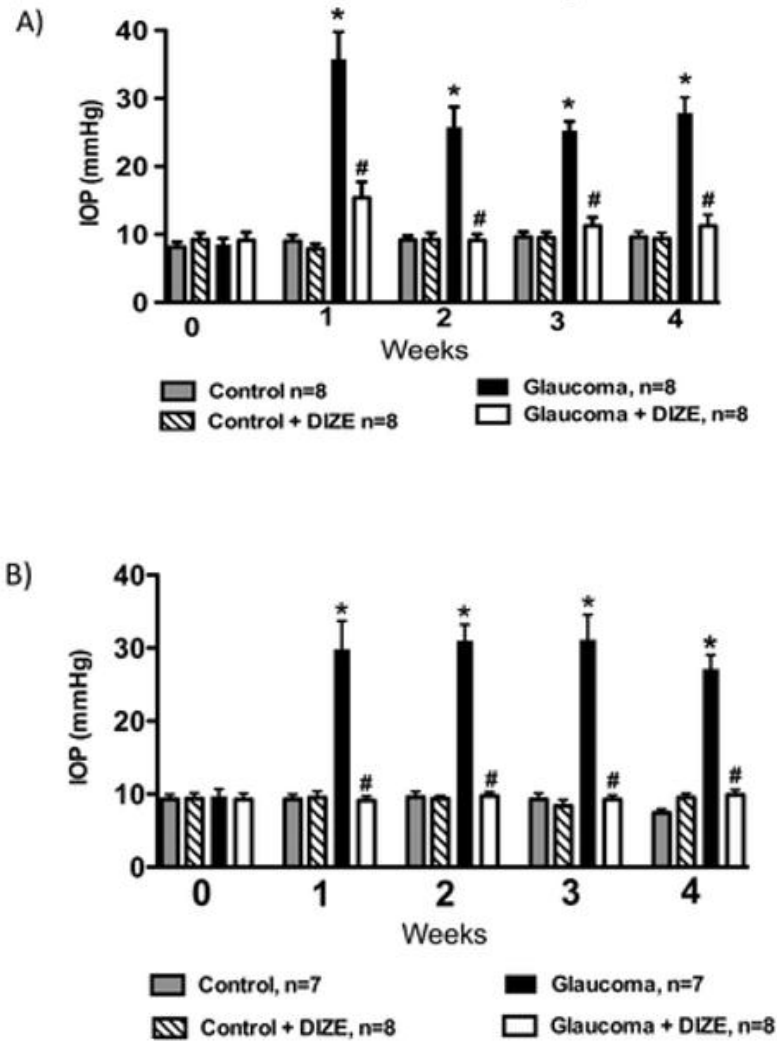
ANEXO D

Gráfico D: variação da pressão intra-ocular (PIO) de coelhos normotensos após administração intravítrea de (A) angiotensina (1-7) e (B) angiotensina (1-7) seguido de A-779 (VAAJANEN et al., 2014)



ANEXO E

Gráficos E: efeito do DIZE (1mg/Kg) administrado diariamente por via sistêmica (A) e tópica (B) em olhos de ratos induzidos ao glaucoma semanalmente (através da aplicação intracameral de 30 μ L de ácido hialurônico) desde a primeira semana do experimento (FOUREAUX et al., 2015).



ANEXO F

Gráfico F: efeito do DIZE (1mg/Kg) administrado diariamente por via tópica em olhos de ratos normotensos e em olhos de ratos induzidos ao glaucoma semanalmente (através da aplicação intracameral de 30 μ L de ácido hialurônico) desde a primeira semana do experimento. Efeito da co-administração do A-779, um antagonista do receptor Mas, bloqueando a ação do DIZE sobre a PIO (FOUREAUX et al., 2015).

