

# Alteração do tecido conjuntivo orbitário após aplicação de bimatoprost: estudo experimental em ratos

## *Changes of orbital connective tissue after bimatoprost injection. Experimental study in rats*

Nilson Lopes da Fonseca Junior<sup>1</sup>, Giuliana Petri<sup>1</sup>, Juliana Mora Veridiano<sup>1</sup>, José Ricardo Carvalho Lima Rehder<sup>1</sup>

### RESUMO

O bimatoprost é utilizado comumente como a droga de primeira escolha no tratamento do glaucoma primário de ângulo aberto. Hiperemia conjuntival, crescimento dos cílios, enoftalmia, escurecimento cutâneo periocular, sulco palpebral profundo e prurido ocular têm sido relatados em pacientes que receberam bimatoprost em doses únicas diárias durante cerca de 3 meses. O mecanismo exato para estes efeitos adversos permanece desconhecido. **Objetivo:** Verificar em animais de experimentação, as alterações do tecido conjuntivo orbitário após injeção retrobulbar de bimatoprost 0,03%. **Métodos:** Foram utilizados trinta e seis ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) submetidos a diferentes períodos de injeção retrobulbar de bimatoprost à direita. O material exenterado foi submetido à análise histológica, morfométrica (diâmetro, densidade numérica e densidade de volume dos adipócitos) e imuno-histoquímica para marcação do VEGF. Os resultados destas análises foram submetidos à análise descritiva com o auxílio do software R. O nível de significância adotado foi 5%. Para as comparações foi proposto o modelo de regressão linear com efeitos mistos. **Resultados:** Na amostra estudada, as órbitas submetidas a injeções retrobulbares de bimatoprost apresentaram ao redor do nervo óptico tecido conjuntivo mais espesso, com inúmeros capilares e vasos de vários calibres e a redução da quantidade, diâmetro e volume das células adiposas estatisticamente significativo quando comparado à órbita contralateral e ao grupo controle. **Conclusão:** Neste estudo observaram-se as seguintes alterações potencialmente reversíveis do tecido conjuntivo orbitário nos ratos submetidos à injeção retrobulbar de bimatoprost: 1) redução da quantidade, do diâmetro e do volume das células adiposas orbitárias; 2) neovascularização local; 3) espessamento e remodelamento das fibras de colágeno na cavidade orbitária.

**Descritores:** Antagonistas de prostaglandina/efeitos adversos, Tecido conjuntivo/ efeitos de drogas; Ratos

### ABSTRACT

*Bimatoprost is commonly used as the drug of first choice in the treatment of primary open-angle glaucoma. Conjunctival hyperemia, eyelash growth, enophthalmos, periocular skin pigmentation, deep lid sulcus and itching eyes have been reported in patients that daily received single dosages during a three month period. The exact mechanism for these adverse effects remains unknown. Objective: to verify alterations, in test animals, of the orbital connective tissue after peribulbar injections of bimatoprost 0.03% using histological and immune-histochemical analysis. Methods: thirty six male test rats (*Rattus norvegicus albinus*) were subjected to various periods of periocular injections of bimatoprost 0.03% in the right eye. All extracted material was submitted to histological, morphometric (diameter, numeric density and density of adipocyte volume) and immune-histochemical analysis to mark the vascular endothelial growth factor (VEGF). These analysis results were then submitted to a descriptive analysis with the help of R software. The significance level used was 5%. For comparison, the model of linear regression with mixed effects was proposed. Results: In the sample studied, the eye sockets that were continuously submitted to bimatoprost had a denser conjunctival tissue around the optic nerve, with numerous capillaries and blood vessels of various sizes and a reduction of quantity, diameter and volume of adipose cells of statistic importance when compared to the contralateral eye socked and the control group. Conclusion: In this study, the following potentially reversible changes of orbital connective tissue were observed in test rats subjected to periocular injection of bimatoprost: 1) reduction of quantity, diameter and volume of orbital adipose cells; 2) local neovascularization; 3) thickening and remodeling of collagen fibers in the orbital cavity*

**Keywords:** Antagonists of prostaglandins/adverse effects, Connective tissue/drug effects; Rats

1. Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Recebido para publicação em 17/02/2015 - Aceito para publicação em 06/06/2016

## INTRODUÇÃO

Dentre as causas de cegueira irreversível, o glaucoma é a mais comum no mundo, sendo o glaucoma crônico primário de ângulo aberto o mais frequente.<sup>(1)</sup> Comumente o bimatoprost é utilizado como a droga de primeira escolha no tratamento do glaucoma primário de ângulo aberto, e geralmente é bem tolerado.<sup>(2)</sup> O bimatoprost 0,03% colírio é uma prostamida com potente ação hipotensora ocular<sup>(3)</sup>. Trata-se de um análogo sintético da prostaglandina F<sub>2</sub> α (PGF<sub>2</sub> α)<sup>(2)</sup> que reduz a PIO em humanos pois incrementa a drenagem uveoescleral ou não convencional do humor aquoso<sup>(4)</sup>

Sua seletividade imita os efeitos da prostamida F<sub>2</sub>α, substância que existe naturalmente. A PGF<sub>2</sub> α é sintetizada por uma via envolvendo a COX-2, mas não a COX-1, sugerindo uma nova via que leva à síntese de amidas lipídicas endógenas que reduzem a pressão intraocular (PIO). O bimatoprost difere das prostaglandinas, pois não estimula os receptores prostanoídes, não é mitogênico, não contrai o útero humano e é eletroqui-micamente neutro<sup>(5,6)</sup>

Estudos clínicos relatam eventos adversos oculares e perioculares em 15 a 45% dos pacientes que receberam doses únicas diárias em colírio, durante três meses. Em ordem decrescente de incidência os efeitos adversos mais observados foram: hiperemia conjuntival, crescimento dos cílios e prurido ocular<sup>2</sup> Aproximadamente 3% dos pacientes interromperam o tratamento por causa dos eventos adversos<sup>(7)</sup>.

As alterações órbito-palpebrais atribuídas ao uso de bimatoprost como sulco palpebral profundo, enoftalmia e atenuação da dermatocálase têm sido relatadas com maior frequência nos últimos anos<sup>(8,9)</sup>. Os pioneiros foram Peplinski e Albani Smith, que relacionaram a presença de sulco palpebral superior profundo e atenuação da dermatocálase unilaterais e ipsilaterais ao uso do bimatoprost 0,03% colírio em três pacientes caucasianos<sup>(8)</sup>.

Outro efeito adverso palpebral observado foi o aumento da fenda palpebral, que pode ser decorrente da estimulação do músculo de Muller pela prostamida, que provavelmente medeia o relaxamento e a contração da célula muscular lisa<sup>(10)</sup>. Alguns autores observaram uma melhora dos sinais considerados efeitos colaterais após a suspensão da medicação<sup>(10)</sup>.

As prostaglandinas, mais especificamente a PGE1 pode induzir angiogênese indiretamente por meio da indução da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)<sup>(11)</sup>.

No entanto, todos esses mecanismos propostos para os efeitos adversos conhecidos do bimatoprost e outros análogos da prostaglandina não parecem causar um sulco palpebral profundo. Postulou-se que tanto a contração ou fibrose do músculo de Muller e atrofia da gordura orbital podem afetar o aparecimento desse efeito adverso<sup>(9)</sup>, mas o mecanismo exato permanece desconhecido.

Neste estudo objetivamos verificar em ratos, mediante análise histológica e imuno-histoquímica, as alterações do tecido conjuntivo orbitário após aplicação peribulbar de bimatoprost 0,03%.

## MÉTODOS

Foram utilizados trinta e seis ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar pesando aproximada-

mente 400 gramas, fornecidos e mantidos pelo biotério central da Faculdade de Medicina do ABC. Os animais foram divididos em oito grupos. Alguns animais foram submetidos ininterruptamente a uma injeção retrobulbar de bimatoprost semanalmente na órbita direita por 4 semanas (**Grupo 1 ou G1**, n=05), 8 semanas (**Grupo 2 ou G2**, n=06) e 12 semanas (**Grupo 3 ou G3**, n=05). Alguns animais foram submetidos a uma injeção retrobulbar de bimatoprost semanalmente na órbita direita por 12 semanas e se mantiveram sem medicação por 4 semanas (**Grupo 4 ou G4**, n=03), 8 semanas (**Grupo 5 ou G5**, n=05) e por 12 semanas (**Grupo 6 ou G6**, n=06). No Grupo Controle (**CO**, n=06) os animais foram submetidos à injeção retrobulbar de soro fisiológico semanalmente na órbita direita por 4 semanas. Estas injeções apresentavam um volume idêntico às injeções realizadas nos animais dos outros grupos do estudo.

A quantidade injetada de bimatoprost foi de 49 µg, sendo determinada da seguinte maneira: O medicamento injetado foi o colírio de bimatoprost 0,03%. O frasco deste colírio contém 3 ml, sendo que cada ml (41 gotas) contém 0,3 mg de bimatoprost. A posologia deste colírio é de 1 gota ao dia, ou seja, 7 gotas semanalmente. Portanto, se 1 ml de colírio (41 gotas) contém 0,3 mg de bimatoprost, 1 gota contém 0,007 mg, e 7 gotas contêm 0,049 mg ou 49 µg. Baseado no estudo de Woodward et al<sup>(6)</sup> esta dose foi segura para os animais. Woodward et al<sup>(6)</sup> utilizaram 2 gotas diárias de bimatoprost 0,1% em macacas com peso de 2kg e com esta dose foram detectados traços de substâncias metabólicas no sangue dos animais, garantindo que esta dose não era tóxica. Esta dose de 2 gotas diárias de bimatoprost 0,1% equivale a 6 gotas diárias de bimatoprost 0,3%, ou seja, 42 gotas por semana em animais de 2 kg. Com isso podemos sugerir que em um animal de 400g uma dose de até 8,4 gotas semanalmente não é tóxica.

Para a aplicação do medicamento, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (5 mg/kg) e ketamina (10 mg/kg) aplicada via intraperitoneal<sup>(6)</sup>. Após indução anestésica, foi feita a antisepsia das pálpebras com álcool iodado e foi aplicada uma injeção peribulbar de bimatoprost 0,03% na órbita direita (49 µg/órbita/semana).

Após o período de estudo determinado para cada grupo, os animais foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> e, em seguida, foram submetidos à exenteração orbitária bilateral com o auxílio de um microscópio cirúrgico.

Todo o material exenterado foi enviado para confecção de lâminas histológicas, sendo desprezados os primeiros 100µm do bloco, uma vez que, como observado na fase piloto deste estudo, nessa região a presença de tecido adiposo é máxima para a maioria dos ratos. **As Lâminas foram** submetidas à Coloração Hematoxilina-Eosina e Estudo imuno-histoquímico. Com a coloração Hematoxilina-Eosina, foram realizadas as análises histológicas descritiva e morfométrica, sendo que na análise morfométrica foram realizadas as estimativas do diâmetro dos adipócitos (Dv), da densidade numérica dos adipócitos (Nv) e da densidade de volume dos adipócitos (Vv). O estudo imunohistoquímico foi realizado para análise da marcação do fator de crescimento endotelial vascular - VEGF (anti-VEGF Igb 1 - Abcam, Cambridge, MA, USA).

Na análise morfométrica para a estimativa do diâmetro dos adipócitos (Dv) foram selecionadas fotomicrografias de cada grupo no aumento de 100X. Os dados foram obtidos tomando a medida do diâmetro de 100 adipócitos por grupo, escolhidos ao acaso. A seguir, foi realizado o cálculo da média das 100 medidas para cada grupo. As medidas do diâmetro dos adipócitos foram feitas utilizando a ferramenta *straight line* do Programa Image J Launcher

Para avaliação da densidade de superfície de um determinado componente celular é necessário superpor um retículo de linhas a uma fotomicrografia e proceder à contagem do número de intersecções entre a superfície do objeto e as linhas de referência. Isso nos dá uma medida da densidade de superfície daquele componente, em certa unidade de área considerada. Para a estimativa da densidade numérica ( $N_v$ ) dos adipócitos estudados foi utilizado o método proposto por Aherne<sup>(12)</sup>, que é dado pela fórmula:

$$N_v = \frac{2 \cdot N_A}{i \cdot d + 2t}, \text{ onde:}$$

$N_v$  = densidade numérica dos adipócitos;

$N_A$  = número de adipócitos por unidade de área;

$i$  = número de intersecções linha/ adipócito dividido pelo número de adipócitos na área estudada;

$d$  = distância entre as linhas;

$t$  = espessura do corte.

Para a avaliação da densidade de volume dos adipócitos ( $V_v$ ) também foi necessário um retículo de pontos sobreposto à fotomicrografia e utilizada a relação proposta por proposta por Weibel<sup>(13)</sup>

$$V_v = P1/P, \text{ onde:}]$$

$V_v$  = densidade de volume de um determinado componente;

$P1$  = número de pontos incidentes sobre o componente em estudo;

$P$  = total de pontos incidentes sobre a unidade de volume

Quanto a análise estatística, primeiramente realizou-se uma análise exploratória dos dados, com o objetivo de sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo que se tenha uma visão global da variação desses valores, organizando e descrevendo os dados por meio de tabelas com medidas descritivas e de gráficos<sup>(14)</sup>. O nível de significância adotado foi 5%.

Para as comparações foi proposto o modelo de regressão linear com efeitos mistos. Este modelo é utilizado na análise de dados em que as respostas estão agrupadas, ou seja mais de uma medida para um mesmo indivíduo, e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada<sup>(14)</sup>.

## RESULTADOS

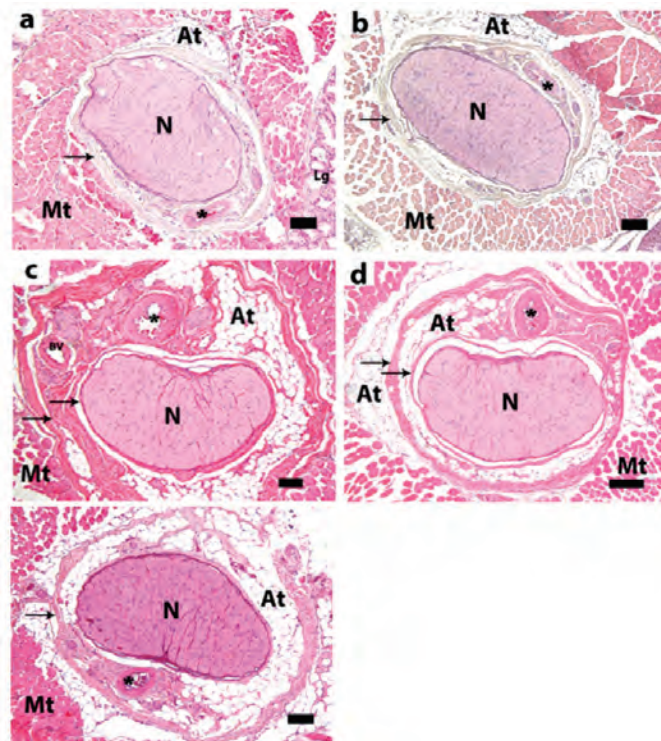
### Análise histológica descritiva

Em todos os grupos analisados observamos o nervo óptico e as camadas conjuntivas preservadas. A dura máter apresenta-se como um tecido conjuntivo denso modelado com grande quantidade de vasos de vários calibres. Ao redor deste tecido conjuntivo há pouca quantidade de tecido adiposo que se apresenta como células esféricas, o citoplasma aparece como um aro periférico, e o núcleo encontra-se na periferia da célula devido à pressão causada pela gota lipídica situada no interior do citoplasma.

**Grupos 1, 2 e 3.** Conforme demonstrado na figura 1, podemos observar que nas órbitas oculares de ambos os lados (direito e esquerdo) o nervo óptico e as camadas conjuntivas estão preservadas. Nota-se na órbita direita que o tecido conjuntivo ao redor do nervo óptico apresenta-se mais espesso e com inúmeros capilares e vasos de vários calibres. Além disso, na órbita direita, podemos observar que a quantidade de tecido adiposo é menor em relação à órbita esquerda (Figura 1). O colágeno

fibrilar do tecido conjuntivo apresenta-se corado em rosa e sua organização típica de tecido conjuntivo denso não modelado.

**Grupos 4, 5 e 6.** Nestes grupos observamos o nervo óptico e camadas conjuntivas preservadas, porém podemos notar grande quantidade de tecido adiposo ao redor do tecido conjuntivo denso (Figura 1).



**Figura 1:** Fotomicrografia – Órbita do rato - Aumento de 10X. HE. a) Animal do Grupo 2 – órbita direita: espessamento da bainha do nervo óptico e redução do volume do corpo adiposo, comparado ao grupo controle. b) Animal do Grupo 2 – órbita esquerda: espessamento da bainha do nervo óptico e redução do volume do corpo adiposo, comparado ao grupo controle, porém em menor intensidade comparado à órbita direita do mesmo grupo. c) Animal do Grupo 6 – órbita direita: observa-se uma semelhança com os achados descritos no grupo controle. d) Animal do Grupo 6 – órbita esquerda: observa-se uma semelhança com os achados descritos no grupo controle e na órbita direita do mesmo grupo. e) Grupo controle. N- Nervo óptico, At- Tecido adiposo, Mt- Tecido muscular, SETA- Tecido conjuntivo ou dura-máter, \*Artéria oftálmica

### Análise histológica morfométrica

Análise comparativa do diâmetro dos adipócitos entre as órbitas do mesmo grupo

A tabela 1 mostra que quando comparamos o diâmetro dos adipócitos (dia) da órbita direita com os da esquerda no mesmo momento, somente os grupos controle (CO) e G6 (animais submetidos à aplicação de bimatoprost por 3 meses e suspensão da medicação por 3 meses) apresentam diferença.

No grupo controle o diâmetro dos adipócitos da órbita direita (OD) é maior ( $p < 0,01$ ) do que os da órbita esquerda (OE), pois a ED (estimativa de diferença) entre a órbita direita e a esquerda é positiva, ou seja:

$$\text{dia OD CO} - \text{dia OE CO} = \text{valor positivo}$$

No grupo 6 o diâmetro dos adipócitos da órbita direita (OD) é menor ( $p < 0,01$ ) do que os da órbita esquerda (OE),



pois a ED (estimativa de diferença) entre a órbita direita e a esquerda é negativa, ou seja:

$$\text{dia OD G6} - \text{dia OE G6} = \text{valor negativo}$$

**Tabela 1**

**Análise comparativa do diâmetro (µm) dos adipócitos entre as órbitas direita e esquerda no mesmo grupo**

Comparações		ED	Valor p
CO	Dir - Esq	0,182	<0,01
G1	Dir - Esq	- 0,001	0,99
G2	Dir - Esq	0,027	0,99
G3	Dir - Esq	- 0,052	0,28
G4	Dir - Esq	- 0,030	0,99
G5	Dir - Esq	- 0,077	0,06
G6	Dir - Esq	- 0,076	<0,01

ED = estimativa da diferença do diâmetro do adipócito entre os grupos

**Análise comparativa dos valores da média do diâmetro dos adipócitos entre o grupo controle e os grupos submetidos à aplicação orbitária de bimatoprost**

A tabela 2 mostra a análise comparativa da média do diâmetro dos adipócitos das órbitas direita (OD) e esquerda (OE) entre o grupo controle (CO) e os demais grupos do estudo.

Observa-se que o diâmetro dos adipócitos foi menor ( $p < 0,01$ ) na órbita direita dos animais submetidos à aplicação de bimatoprost por 1, 2 e 3 meses (Grupos 1, 2 e 3, respectivamente), quando comparados à órbita direita do grupo controle, pois a ED (estimativa da diferença) entre o Grupo controle e os Grupos 1, 2 e 3 é positiva, ou seja:

$$\text{dia ODCO} - \text{dia OD(G1, G2 ou G3)} = \text{valor positivo}$$

A tabela 2 também mostra que o diâmetro dos adipócitos foi maior ( $p < 0,01$ ) na órbita esquerda dos animais submetidos à aplicação de bimatoprost por 3 meses e com suspensão da medicação por 1, 2 e 3 meses (Grupos 4, 5 e 6, respectivamente), quando comparados à órbita esquerda do grupo controle, pois a ED (estimativa da diferença) entre o Grupo controle e os Grupos 4, 5 e 6 é negativa, ou seja:

$$\text{dia OEEO} - \text{dia OE(G4, G5 ou G6)} = \text{valor negativo}$$

**Tabela 2**

**Análise comparativa dos valores da média do diâmetro (µm) dos adipócitos entre grupos**

Órbita direita			Órbita esquerda		
Comparações	ED	Valor de p	Comparações	ED	Valor de p
CO-G1	0,242	<0,01	CO-G1	0,059	0,85
CO-G2	0,242	<0,01	CO-G2	0,071	0,65
CO-G3	0,206	<0,01	CO-G3	- 0,028	0,99
CO-G4	- 0,030	0,99	CO-G4	- 0,242	<0,01
CO-G5	- 0,021	0,99	CO-G5	- 0,280	<0,01
CO-G6	- 0,047	0,92	CO-G6	- 0,305	<0,01

ED = estimativa da diferença do diâmetro do adipócito entre os grupos

**Análise comparativa dos valores da média do diâmetro dos adipócitos entre os grupos submetidos à aplicação orbitária de bimatoprost**

A tabela 3 mostra que o diâmetro dos adipócitos foi menor ( $p < 0,01$ ) nas órbitas direita dos animais submetidos à aplicação de bimatoprost por 1, 2 e 3 meses (Grupos 1, 2 e 3, respectivamente), quando comparados ao diâmetro dos adipócitos da órbita direita dos animais submetidos à aplicação de bimatoprost por 3 meses e com suspensão da medicação por 1, 2 e 3 meses (Grupos 4, 5 e 6, respectivamente), pois a ED (estimativa da diferença) entre os Grupos 1, 2 e 3 e os Grupos 4, 5 e 6 é negativa, ou seja:

$$\text{dia (G1, G2 ou G3) OD} - \text{dia (G4, G5 ou G6) OD} = \text{valor negativo}$$

A tabela 3 também mostra que o diâmetro dos adipócitos foi menor ( $p < 0,01$ ) na órbita esquerda dos animais submetidos à aplicação de bimatoprost por 1, 2 e 3 meses (Grupo 1, 2 e 3, respectivamente), quando comparados ao diâmetro dos adipócitos da órbita esquerda dos animais submetidos à aplicação de bimatoprost por 3 meses e com suspensão da medicação por 1, 2 e 3 meses (Grupo 4, 5 e 6 respectivamente), pois a ED (estimativa da diferença) entre os Grupos 1, 2 e 3 e os Grupos 4, 5 e 6 é negativa, ou seja:

$$\text{dia (G1, G2 ou G3)OE} - \text{dia (G4, G5 ou G6)OE} = \text{valor negativo}$$

**Tabela 3**

**Análise comparativa dos valores da média do diâmetro (µm) dos adipócitos entre grupos submetidos ao bimatoprost**

Órbita direita			Órbita esquerda		
Comparações	ED	Valor de p	Comparações	ED	Valor de p
G1 - G2	-0,016	0,99	G1 - G2	0,012	0,99
G1 - G3	-0,036	0,99	G1 - G3	-0,087	0,25
G1 - G4	-0,279	<0,01	G1 - G4	-0,301	<0,01
G1 - G5	-0,289	<0,01	G1 - G5	-0,339	<0,01
G1 - G6	-0,289	<0,01	G1 - G6	-0,364	<0,01
G2 - G3	-0,019	0,99	G2 - G3	-0,099	0,12
G2 - G4	-0,255	<0,01	G2 - G4	-0,313	<0,01
G2 - G5	-0,247	<0,01	G2 - G5	-0,351	<0,01
G2 - G6	-0,273	<0,01	G2 - G6	-0,376	<0,01
G3 - G4	-0,236	<0,01	G3 - G4	-0,214	<0,01
G3 - G5	-0,228	<0,01	G3 - G5	-0,252	<0,01
G3 - G6	-0,254	<0,01	G3 - G6	-0,277	<0,01
G4 - G5	-0,008	0,99	G4 - G5	-0,038	0,99
G4 - G6	-0,017	0,99	G4 - G6	-0,063	0,86
G5 - G6	-0,026	0,99	G5 - G6	-0,025	0,99

ED = estimativa da diferença do diâmetro do adipócito entre os grupos

**Análise descritiva do número de adipócitos, da média do diâmetro dos adipócitos (µm) e da porcentagem do volume orbitário preenchido pelo tecido adiposo em cada grupo**

A tabela 4 mostra que houve uma redução no número de adipócitos nos animais submetidos continuamente à aplicação de bimatoprost na órbita direita durante 1, 2 e 3 meses (Grupos 1, 2 e 3, respectivamente), quando comparado ao grupo controle. Esta redução numérica foi maior na órbita direita (local de aplicação do bimatoprost) do que na esquerda. Observa-se também que, após a suspensão da medicação por 1, 2 e 3 meses (Grupos 4, 5 e

6, respectivamente), houve um aumento no número de adipócitos, numericamente parecido com os achados do Grupo controle.

Quanto à média do diâmetro dos adipócitos, a tabela 4 mostra redução destes valores quando comparados aos do Grupo controle. Esta redução foi maior na órbita direita do que na esquerda. Observa-se também que, após a suspensão da medicação por 1, 2 e 3 meses (Grupos 4, 5 e 6, respectivamente), houve um aumento na média do diâmetro dos adipócitos, numericamente parecidos na órbita direita e maiores na esquerda quando comparados aos valores do grupo controle.

Nota-se que o corpo adiposo nos animais submetidos continuamente à aplicação de bimatoprost na órbita direita durante 1, 2 e 3 meses (Grupos 1, 2 e 3, respectivamente) apresenta um volume menor na órbita quando comparado ao dos animais do Grupo controle, tanto à direita como à esquerda. Observa-se também que, após a suspensão da medicação por 1, 2 e 3 meses (Grupos 4, 5 e 6, respectivamente), o corpo adiposo orbitário apresenta um volume numericamente parecido com o CO e um volume maior quando comparados aos valores dos animais que foram expostos ao bimatoprost continuamente.

Tabela 4

**Análise descritiva do número de adipócitos, da média do diâmetro dos adipócitos ( $\mu\text{m}$ ) e a porcentagem do volume orbitário preenchido pelo corpo adiposo em cada grupo**

Grupo	Órbita	N <sub>AD</sub>	Dia	Vol
CO	Dir	145,8	0,5	35
	Esq	185	0,33	46
G1	Dir	89	0,25	26
	Esq	124	0,25	32
G2	Dir	72	0,27	23
	Esq	150	0,24	36
G3	Dir	84,56	0,28	25,2
	Esq	128,67	0,34	32,6
G4	Dir	173,95	0,52	39,4
	Esq	241	0,55	48,8
G5	Dir	187,75	0,51	41,4
	Esq	189	0,58	41,6
G6	Dir	177,77	0,53	40
	Esq	199	0,6	42

N<sub>AD</sub> = número de adipócitos

Dia = média do diâmetro dos adipócitos

Vol = Porcentagem do volume orbitário composto pelo corpo adiposo

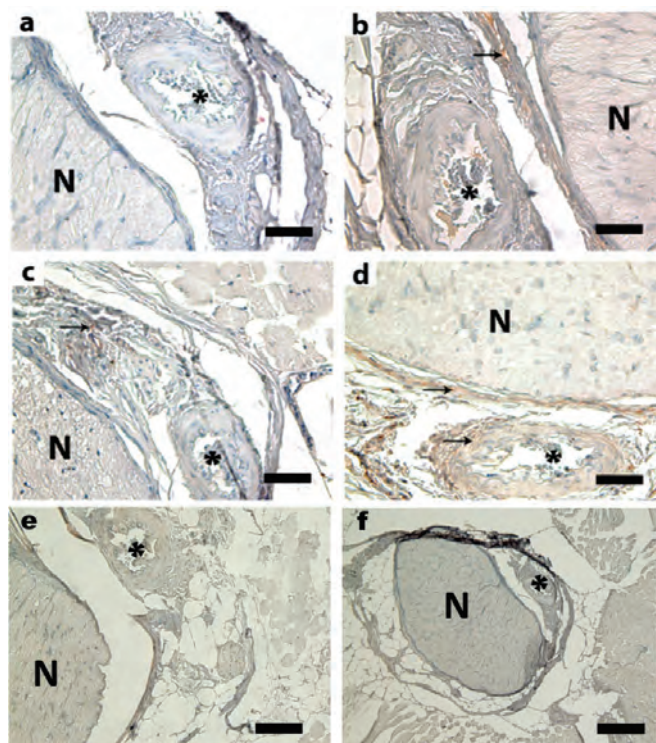
#### Análise Imuno-histoquímica

**Grupos 1, 2 e 3.** Os resultados obtidos no estudo imuno-histoquímico do anti-VEGF revelam que há marcação positiva (cor acastanhada) somente nas órbitas direitas dos grupos tratados (Figura 2). No Grupo controle a marcação, embora positiva, ocorreu com pouca intensidade.

**Grupos 4, 5 e 6.** Os resultados imuno-histoquímicos para identificação do VEGF mostram marcação positiva (cor acastanhada), porém com menor intensidade (Figura 2) em comparação ao observado nos grupos 1, 2 e 3.

## DISCUSSÃO

Este estudo traz uma descrição das alterações histológicas e imuno-histoquímicas do tecido conjuntivo orbitário após inje-



**Figura 2 :** Fotomicrografia – Órbita do rato. IH. a) Aumento de 40X – VEGF - Grupo controle – órbita esquerda. Ausência de neovasos. b) Aumento de 40X – VEGF - Grupo 1 – órbita esquerda. Presença de neovasos c) Aumento de 40X – VEGF - controle – órbita direita. Ausência de neovasos d) Aumento de 40X – VEGF - Grupo 1 – órbita direita. Presença de neovasos. e) Aumento de 40X – VEGF - Grupo 5 – órbita esquerda. Ausência de neovasos. f) Aumento de 40X – VEGF - Grupo 5 – órbita direita. Ausência de neovasos N- Nervo óptico, SETA- Tecido conjuntivo ou dura-máter, \* Artéria oftálmica

ção retrobulbar de bimatoprost 0,03%. São descritos na literatura apenas os achados clínicos adversos ao uso do colírio de bimatoprost 0,03% em pacientes glaucomatosos. Peplinski e Smith relataram sulcos palpebrais superiores profundos unilaterais e ipsilaterais<sup>(13)</sup>. Filippopoulos et al. descreveram sulcos palpebrais superiores profundos, aparente enoftalmo e atenuação da dermatocálase<sup>(15)</sup>. Baseada principalmente nas propriedades farmacológicas do bimatoprost a hipótese de que estas alterações palpebrais e orbitárias fossem decorrentes da redução da gordura pré-aponeurótica e orbitária foi aventada<sup>(13,16,17)</sup>. Ainda que haja uma pequena diferença na anatomia e fisiologia da órbita entre as espécies, os conhecimentos adquiridos em estudos com animais podem auxiliar em pesquisas nos humanos.

O rato (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar foi escolhido para este estudo devido ao seu tamanho, facilidade de manuseio, disponibilidade, número de animais necessário para estudo comparativo, anatomia e fisiologia orbitária e palpebral semelhantes à humana<sup>(18,19)</sup>. A escolha de animais adultos foi fundamentada na necessidade de evitar um crescimento da cavidade orbitária e de seu conteúdo durante o estudo, principalmente nos animais que participaram do estudo por 24 semanas (Grupo 6). Foram utilizadas apenas machos, com o intuito de padronizar os grupos.

O número de animais que participaram deste estudo foi definido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal

(CEEA) da FMABC sendo autorizado o mínimo suficiente para o desenvolvimento do estudo e análise estatística.

Os animais foram divididos em 7 grupos de 6 animais, totalizando 42 animais. Houveram 6 óbitos durante o período de seguimento do estudo distribuídos da forma seguinte: G1 (1 óbito), G3 (1 óbito), G4 (3 óbitos), G5 (1 óbito).

Os animais dos grupos G1, G2 e G3 foram expostos à injeção retrobulbar unilateral (órbita direita) de bimatoprost 0,03% semanalmente por 4, 8 e 12 semanas, respectivamente. O período de exposição foi assim definido pois a literatura relata que o aparecimento dos efeitos adversos em pacientes glaucomatosos são observados principalmente 3 meses após o início do uso do colírio de bimatoprost 0,03%<sup>(13-15)</sup>. A injeção unilateral retrobulbar permite determinar se os efeitos adversos são locais ou sistêmicos.

Após o período máximo de exposição ao bimatoprost 0,03%, os animais dos grupos G4, G5 e G6 foram sacrificados após 4, 8 e 12 semanas sem medicação, respectivamente. O objetivo da análise destes grupos foi de observar o desaparecimento das alterações do tecido conjuntivo orbitário após a suspensão do bimatoprost 0,03% e o tempo necessário para esta reversão. Alguns autores relatam a melhora dos sinais após a suspensão da medicação<sup>(15)</sup>.

Os animais do G7 (Grupo controle) foram submetidos à injeção unilateral retrobulbar (órbita direita) de solução salina semanalmente por 4 semanas com o objetivo de excluir possíveis alterações do tecido conjuntivo orbitário desencadeados por processos inflamatórios relacionados ao trauma orbitário (injeção retrocular).

A via de administração do bimatoprost 0,03% escolhida para este estudo foi a injeção retrobulbar a qual assegura que o tecido orbitário foi exposto à dose da medicação durante todo o período preconizado para cada grupo. A dose utilizada para cada injeção foi equivalente a dose semanal de bimatoprost 0,03% preconizada para o tratamento do glaucoma (7 gotas = 49 µg).

No presente estudo foi observada uma redução do diâmetro e do número de adipócitos nas órbitas que foram submetidas ininterruptamente às injeções semanais de bimatoprost 0,03% por 30, 60 e 90 dias (Grupo 1, 2 e 3, respectivamente) em relação ao grupo controle. Este resultado sugere que o bimatoprost reduz a quantidade e o volume das células adiposas. Choi et al. concluíram que o bimatoprost inibe tanto a diferenciação dos pré-adipócitos como o acúmulo lipídico intracelular<sup>(16)</sup>. Segundo Kim, os análogos da prostaglandina apresentam um evento inibitório especialmente no estágio tardio da diferenciação dos adipócitos<sup>(17)</sup>.

Também foi observada uma redução do diâmetro e do número de adipócitos na órbita direita dos animais dos Grupos 1, 2 e 3, quando comparado à órbita direita dos animais dos Grupos 4, 5 e 6 (animais submetidos ininterruptamente às injeções semanais de bimatoprost 0,03% por 90 dias, seguidas pela suspensão da medicação por 30, 60 e 90 dias, respectivamente). Estes resultados sugerem que a suspensão do bimatoprost 0,03% por 30 dias é suficiente para a reversão do seu efeito no tecido adiposo.

O efeito reversível do bimatoprost é relatado na literatura. Yam et al.<sup>(10)</sup> descreveram aprofundamento do sulco palpebral superior bilateralmente em um paciente asiático que utilizou bimatoprost 0,03% diariamente por três meses, sendo observada melhora dos sinais quatro semanas após a suspensão da medicação. Filippopoulos et al.<sup>(15)</sup> observaram atenuação parcial ou completa dos sulcos palpebrais superiores profundos e do

enofalmo em usuários crônicos de bimatoprost 0,03% após três a seis meses da suspensão do bimatoprost.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o diâmetro dos adipócitos nas órbitas direita e esquerda nos grupos 1, 2 e 3, e tampouco nos grupos 4, 5 e 6. Estes resultados demonstram uma similaridade do diâmetro dos adipócitos entre a órbita direita e esquerda nos animais do mesmo grupo, e sugerem um efeito sistêmico e reversível da injeção orbitária de bimatoprost, uma vez que a injeção era unilateral (órbita direita). Um estudo em macacos<sup>(10)</sup> demonstrou que a administração sistêmica do bimatoprost ocasiona efeitos adversos mais precoces, relatando a presença de um proeminente sulco periorbitário e aumento da fenda palpebral com a administração intravenosa de bimatoprost por 17 semanas. Os mesmos sinais foram observados na maioria dos macacos estudados 6 meses após o início do uso de bimatoprost colírio em doses de 0,03%, duas vezes ao dia, ou 0,1%, uma vez ao dia. Estudos farmacocinéticos<sup>(9)</sup> realizados em macacos demonstraram que em uma única instilação de bimatoprost 0,1% colírio foi observada uma concentração duas mil vezes maior de bimatoprost nas pálpebras do que no humor aquoso, e 16 vezes maior na íris e no corpo ciliar, o que indica significante absorção periorbitária da medicação, justificando os efeitos adversos locais.

O diâmetro dos adipócitos da órbita direita do grupo controle (órbita submetida à injeção de solução salina semanal por 30 dias) foi maior quando comparado à órbita esquerda dos animais do mesmo grupo, e às órbitas direita e esquerda dos grupos 1, 2 e 3. Por outro lado, o diâmetro dos adipócitos da órbita direita do CO foi semelhante aos achados da órbita direita e esquerda dos grupos 4, 5 e 6. Estes achados sugerem que: 1) o trauma orbitário e/ou a solução salina podem ser um estímulo para aumento do diâmetro dos adipócitos, e que o bimatoprost pode ser o responsável pela redução deste diâmetro e do número de células lipídicas; 2) após a suspensão do bimatoprost houve estímulo compensatório para o aumento do diâmetro e do número das células adiposas.

Apesar da redução volumétrica do corpo adiposo e numérica dos adipócitos, um aumento significativo de vasos e capilares (neovascularização) e um remodelamento e espessamento das fibras de colágeno foram observados nos animais dos grupos 1, 2 e 3 em relação ao grupo controle. Nos grupos 4, 5 e 6 não foram observados neovasos, tampouco remodelamento e espessamento das fibras de colágeno. Estes resultados sugerem que o bimatoprost altera, além do tecido adiposo, outros componentes do tecido conjuntivo, e que este efeito adverso também é reversível.

A descrição da prostaglandina (PG) como uma promotora de neovascularização é relatada na literatura, especialmente o subtipo PGE<sub>1</sub><sup>(11)</sup>. Trata-se de uma das substâncias utilizadas para promover a angiogênese terapêutica. É uma substância vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária. Apresenta ainda atividade na ativação da fibrinólise, na modulação da proliferação celular, fibrinogênese, na atividade hemorreológica sobre o eritrócito, na inibição e na ativação de neutrófilos, e ainda melhora a utilização do oxigênio e da glicose pelos tecidos<sup>(18)</sup>.

Além desses efeitos, há evidências de que a PGE<sub>1</sub> estimule a angiogênese em situações de isquemia miocárdica<sup>(18)</sup>. A angiogênese é modulada por fatores de crescimento que se localizam nas células endoteliais e na matriz extracelular<sup>(18-20)</sup>.



O VEGF está associado ao início do processo de neoformação vascular, e é considerado um marcador confiável do processo<sup>(20)</sup>. No presente estudo, a análise imuno-histoquímica demonstrou positividade do anticorpo anti-VEGF, somente nas órbitas direitas dos grupos tratados com bimatoprost. A presença de neovasos e o aumento da trama vascular podem contribuir para a redução do corpo adiposo local devido ao aumento da temperatura, semelhante ao que ocorre nas varizes orbitárias<sup>(21)</sup>. Não há na literatura nenhum estudo que correlacione o bimatoprost ao aparecimento de neovascularização ocular ou periocular. Scherer, em 2006, não encontrou relação entre o uso crônico de colírio de bimatoprost e o aparecimento de membrana coroideana neovascular em pacientes portadores de GCPAA e DMRI<sup>(22)</sup>.

Alterações nas fibras colágenas decorrentes do uso de PG são relatadas na literatura e divergem conforme o tipo da PG. Em um estudo realizado em ratos, a microscopia eletrônica da pele revelou alterações estruturais das células epidérmicas e fibroblastos após a administração de PG-E, incluindo um aumento nos polirribossomos, retículo endoplasmático, grânulos de queratohialina e dilatação dos espaços intercelulares; enquanto a PGF2alfa induziu uma citólise avançada e desintegração celular. A microscopia eletrônica de varredura mostrou fibras colágenas hipertrofiadas em ratos tratados com PGE; no entanto, uma ruptura e a desintegração das fibras colágenas ocorreram em ratos tratados com PG-F2alfa. Estes resultados demonstram que as prostaglandinas são potentes reguladores da estrutura celular da epiderme e do metabolismo, bem como para a síntese de colágeno<sup>(11)</sup>. Em outro estudo realizado em coelhos observou-se que a exposição repetida do tendão de Aquiles à PG-E2 pode causar uma redução do colágeno tipo I, um aumento do colágeno tipo III, uma redução na unidade de densidade das fibras colágenas e uma redução no diâmetro das fibras de colágeno, o que estaria relacionado a uma tendinopatia<sup>(11)</sup>.

Em olhos de coelhos tratados com colírio de análogo de PG-F2alfa observou-se um infiltrado inflamatório conjuntival difuso e moderado, porém sem alterações na espessura epitelial conjuntival ou maior densidade de colágeno subconjuntival<sup>(23)</sup>. No presente estudo foi observado um espessamento das fibras colágenas da cavidade orbitária nos grupos que receberam o bimatoprost.

Na literatura é citado que o bimatoprost difere das prostaglandinas, pois não estimula os receptores prostanoídes, não é mitogênico, não contrai o útero humano e é eletroquimicamente neutro<sup>(7-9)</sup>. Entretanto, neste estudo, observou-se a presença de neovasos, redução do diâmetro e do número de adipócitos, além de alterações de fibras do tecido conjuntivo orbitário durante a administração do bimatoprost, sugerindo uma ativação dos receptores prostanoídes.

Os efeitos adversos do bimatoprost observados neste estudo foram consequentes à aplicação retrobulbar da medicação, porém não podemos considerar que as mesmas alterações serão observadas caso a medicação seja administrada sob a forma de colírio. Com isso novas pesquisas devem ser realizadas para observarmos as possíveis alterações do tecido conjuntivo orbitário após instilação contínua bimatoprost 0,03% colírio e compararmos aos resultados deste estudo.

## CONCLUSÃO

Neste estudo observou-se as seguintes alterações potencialmente reversíveis do tecido conjuntivo orbitário nos

ratos submetidos à injeção retrobulbar de bimatoprost: redução da quantidade, do diâmetro e do volume das células adiposas orbitárias; neovascularização local e espessamento e remodelamento das fibras de colágeno na cavidade orbitária.

## REFERÊNCIAS

1. Salai AF, Souza TT, Netto, AA; Oliveira, LS; Shimono, CT, Cunha, R Dal IOglia da. Epidemiological profile of patients with glaucoma sent to HU-UFSC ophthalmology service. *ACM Arq Catarin Med.* 2011;40(3):37-42.
2. Parrish RK, Palmberg P, Sheu WP. A comparison of latanoprost, bimatoprost, and travoprost in patients with elevated intraocular pressure: a 12-week, randomized, masked-evaluator multicenter study. *Am J Ophthalmol.* 2003;135(5):688-703.
3. Cantor LB, WuDunn D, Cortes A, Hoop J, Knotts S. Ocular hypotensive efficacy of bimatoprost 0.03% and travoprost 0.004% in patients with glaucoma or ocular hypertension. *Surv Ophthalmol.* 2004;49 Suppl 1:S12-8.
4. Brubaker RF. Mechanism of action of bimatoprost (Lumigan). *Surv Ophthalmol.* 2001;45 Suppl 4:S347-51.
5. Easthope SE, Perry CM. Topical bimatoprost: a review of its use in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging.* 2002;19(3):231-248.
6. Woodward DF, Krauss AH, Chen J et al. Pharmacological characterization of a novel antiglaucoma agent. Bimatoprost (AGN 192024). *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305(2):772-85.
7. Vogel R, Strahlman E, Rittenhouse KD. Adverse events associated with commonly used glaucoma drugs. *Int Ophthalmol Clin.* 1999;39(2):107-24.
8. Peplinski LS, Albani Smith K. Deepening of lid sulcus from topical bimatoprost therapy. *Optom Vis Sci.* 2004;81(8):574-577.
9. Park J, Cho HK, Moon JI. Changes to upper eyelid orbital fat from use of topical bimatoprost, travoprost, and latanoprost. *Jpn J Ophthalmol.* 2011;55(1):22-27.
10. Yam JC, Yuen NS, Chan CW. Bilateral deepening of upper lid sulcus from topical bimatoprost therapy. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009;25(5):471-472.
11. Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, Pacher R, Horvath R, Mall G, Glogar HD. Clinical benefit of prostaglandin E1-treatment of patients with ischemic heart disease: stimulation of therapeutic angiogenesis in vital and infarcted myocardium. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(3-4):173-8.
12. Aherne W, Dunnill MS. *Morphometry.* London: Edward Arnold; 1982.
13. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol.* 1969;26:235-302.
14. SCHALL R. Estimation in generalized linear models with random effects. *Biometrika.* 1991;78(4):719-27.
15. Filippopoulos T, Paula JS, Torun N, Hatton MP, Pasquale LR, Grosskreutz CL. Periorbital changes associated with topical bimatoprost. *Ophthalm Plast Reconstr Surg.* 2008;24(4):302-307.
16. Choi HY, Lee JE, Lee JW, Park HJ, Lee JE, Jung JH. In vitro study of antiadipogenic profile of latanoprost, travoprost, bimatoprost, and tafluprost in human orbital preadipocytes. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2012;28(2):146-52.
17. Kim JW. Topical prostaglandin analogue drugs inhibit adipocyte differentiation. *Korean J Ophthalmol.* 2014;28(3):257-264.
18. Li H, Tang K, Deng Y, Xie M, Chang D, Tao X, Xu J. [Effects of exogenous prostaglandin E2 on collagen content of Achilles tendon of rabbits in vivo]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2012;26(3):352-8. Chinese.

19. Lupulescu AP. Cytologic and metabolic effects of prostaglandins on rat skin. *J Invest Dermatol.* 1977;68(3):138-145.
20. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol.* 1997;273(3 Pt 2):H1255-65.
21. Smith RJ, Balbo NS, Lahoz Ibaceta MJ. [Enophthalmos secondary to an orbital varix]. *Medicina (B Aires).* 2014;74(2):127-9. Spanish.
22. Scherer WJ. Effect of topical prostaglandin analog use on outcome following selective laser trabeculoplasty. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2007;23(5):503-12.
23. Serrero G, Lepak NM. Prostaglandin F2alpha receptor (FP receptor) agonists are potent adipose differentiation inhibitors for primary culture of adipocyte precursors in defined medium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233(1):200-2.

---

**Autor correspondente:**

Nilson Lopes da Fonseca Junior  
E-mail: lopesdafonseca@uol.com.br