

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**JULIANA DE LUCENA MARTINS FERREIRA**

**Efeito do ácido rosmarínico sobre parâmetros  
cicatriciais relacionados à cirurgia  
antiglaucomatosa experimental**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2015**

**JULIANA DE LUCENA MARTINS FERREIRA**

**Efeito do ácido rosmarínico sobre parâmetros  
cicatriciais relacionados à cirurgia  
antiglaucomatosa experimental**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Mecanismos  
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e  
Audio-Vestibular.

**Orientador: Prof. Dr. Jayter Silva de Paula**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2015**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Juliana de Lucena Martins

Efeito do ácido rosmarínico sobre parâmetros cicatriciais relacionados à cirurgia antiglaucomatosa experimental. Juliana de Lucena Martins Ferreira; Orientador: Jayter Silva de Paula - Ribeirão Preto, 2015.

124p: 17il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

1. Cirurgia filtrante; 2. Glaucoma; 3. Neovascularização; 4. Ácido rosmarínico, 5. Cicatrização de feridas.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Aluna:** Juliana de Lucena Martins Ferreira

**Título:** Efeito do ácido rosmarínico sobre parâmetros cicatriciais relacionados à cirurgia antiglaucomatosa experimental.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Apoio Financeiro**

**CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior.**

**FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do  
Estado de São Paulo.**

## *Dedicatória*

*Ao meu pai, Walter Martins Ferreira Filho (in memoriam), cujo empenho como professor-pesquisador deixou frutos em gerações de alunos e em mim, como filha e profunda admiradora de sua capacidade intelectual, ética e moral.*

# *Agradecimentos*

*Agradeço à minha família. Ao meu marido, Gustavo, amigo devotado, sempre me apoiando, ajudando e ainda me presenteou durante essa jornada com a nossa filha Clara, a minha razão de viver, que veio coroar de alegria as nossas vidas. À minha mãe Margarete, por todo o apoio e solicitude pra que esse dia chegasse, cuidando da minha filha para que eu pudesse me ausentar e me dedicar à pesquisa. Aos meus irmãos Walter, José e Israel, a torcida pelo meu sucesso e à minha irmã, Sabine, minha colega de trabalho e melhor amiga, por estar sempre disponível com uma palavra de conforto para amenizar os dias de estresse.*

*Agradeço aos meus tios Antônio e Celinha, a acolhida no seu seio familiar, verdadeiros pais adotivos que me encheram de carinho durante a minha estada em Ribeirão Preto. À minha prima Elisa, minha companheira de estudos, conversas e desabafos, que preenchia os meus dias de solidão com a sua amizade fraterna. Aos meus tios Abrahão, Daniel, Levy, Socorrinha e David pelo exemplo de excelentes profissionais e pós-graduados na área de oftalmologia. Enchem-me de orgulho e me deram a honra de fazer parte de suas equipes de trabalho. Ao tio David que durante essa jornada foi um grande mentor, incentivando-me e guiando-me como um pai zeloso.*

*Agradeço à equipe do Biotério do Anexo C, Paulão, Carlinhos e especialmente ao Hermes, que anestesiou os meus coelhos e sempre esteve disponível, auxiliando para que tudo desse certo com o meu experimento.*

*Agradeço às técnicas Vani e Adriana, a ajuda na elaboração das lâminas e imuno-histoquímica, sem elas não seria possível terminar a tese. À técnica Lillian, por fazer o RT-PCR. À Profa. Leandra, que me ajudou a delinear o protocolo histopatológico. À pós-graduanda Lui, que me ensinou a usar o programa ImageJ e à pós-graduanda Carol, que me auxiliou em algumas etapas do experimento. Ao prof Fernando Chahud, que sempre esteve presente auxiliando na avaliação histopatológica, peça fundamental e socorro na análise das lâminas.*

*Agradeço à equipe da secretaria de Oftalmologia, Edson, Rogério e Cecília, sempre solícitos, me ajudaram e me apoiaram durante essa longa jornada.*

## *Agradecimento Especial*

*Agradeço, especialmente, ao meu orientador, Prof. Dr. Jayter Silva de Paula, por todo o empenho para que esta pesquisa apresentasse bons resultados. Foram cinco anos de ensinamentos que levarei por toda a vida. Um modelo de orientador paciente, devotado e amigo. Um exemplo de professor, cujos conhecimentos foram compartilhados, visando o meu crescimento intelectual e profissional.*

*"Na natureza nada se cria, nada se  
perde, tudo se transforma"*

*Lavoisier*

***Resumo***

---

FERREIRA, J.L.M. **Efeito do ácido rosmarínico sobre parâmetros cicatriciais relacionados à cirurgia antiglaucomatosa experimental.** 124f. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

**Introdução:** A cicatrização subconjuntival excessiva é a maior causa de falha cirúrgica no glaucoma. Uma vez que o ácido rosmarínico apresenta ação antifibrótica, é interessante avaliar seu uso como adjuvante na cirurgia filtrante do glaucoma. **Objetivos:** Comparar os achados clínicos e histopatológicos e a expressão gênica de fatores relacionados à cicatrização tecidual entre coelhos submetidos à cirurgia antiglaucomatosa experimental (CAGE) e tratados com injeções subconjuntivais de ácido rosmarínico ou com injeções de solução salina 0,9%. **Material e Métodos:** Estudo experimental intervencionista, do tipo ensaio clínico randomizado, no qual 41 coelhos *New Zealand* foram submetidos à CAGE no olho direito e divididos em dois grupos de tratamento: grupo A (n=21), tratados com injeções subconjuntivais de 0,1 ml de solução salina 0,9% e grupo B (n=20), tratados com injeções subconjuntivais de 0,1 ml de ácido rosmarínico 15 mg/ml (3 dias antes da cirurgia, ao final desta e a cada 3 dias até a eutanásia). Os efeitos do tratamento foram avaliados com cinco dias (grupos A1 e B1) e com 15 dias (grupos A2 e B2) por meio da avaliação da pressão intraocular (PIO) com Tonopen, de aspectos da ampola filtrante com base no *Moorfields Bleb Grading System*, do estudo histopatológico (contagem de neutrófilos/campo, vasos/campo, densidade de colágeno corado com *Sirius Red*, imuno-histoquímica anti- $\alpha$ -actina e anti-VEGF) e do RT-PCR (colágeno tipo 1 alfa-1 – COL1A1 e TGF- $\beta$ 2). As fotomicrografias foram avaliadas quantitativamente com o software ImageJ<sup>®</sup> 1.36 (*Sirius Red*,  $\alpha$ -actina e VEGF) e os dados comparados por testes não paramétricos, sendo  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** Não houve diferença significativa nas comparações da PIO entre os grupos. Nas avaliações da ampola filtrante, apenas o grupo B2 apresentou maiores escores de área central ( $p=0,0004$ ), área máxima ( $p=0,0007$ ) e altura ( $p=0,0239$ ). Os grupos B1 ( $p < 0,0001$ ) e B2 ( $p=0,0011$ ) apresentaram escores significativamente menores no parâmetro vascularização que os seus respectivos controles. Houve diminuição significativa de neutrófilos/campo somente no grupo B2 ( $p=0,0159$ ). O número de vasos/campo também foi significativamente menor nos grupos B1 e B2, em comparação aos seus respectivos controles ( $p=0,0079$  e  $p=0,0345$ , respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas na coloração com *Sirius Red* e na imuno-histoquímica para anti- $\alpha$ -actina entre os grupos, porém o grupo B1 apresentou menor marcação anti-VEGF ( $p=0,0190$ ). As análises por RT-PCR para TGF- $\beta$ 2 e COL1A1 não demonstraram diferenças entre os grupos, com exceção do grupo B2, que apresentou maior expressão de COL1A1 quando comparado ao seu controle ( $p=0,0159$ ). **Conclusões:** Os resultados apontaram para os potenciais efeitos anti-inflamatórios e moduladores da neovascularização do ácido rosmarínico em cirurgias antiglaucomatosas. Apesar do grupo B demonstrar melhor aspecto clínico (exceto a PIO, que não demonstrou diferença entre os grupos), a ação antifibrótica do ácido rosmarínico não pôde ser comprovada.

**Palavras-chave:** Cirurgia filtrante, Glaucoma, Neovascularização, Ácido rosmarínico, Cicatrização de feridas.

***Abstract***

---

FERREIRA, J.L.M. **Rosmarinic acid effect on healing parameters related to experimental glaucoma surgery.** 124f. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

**Introduction:** Excessive subconjunctival scarring is a major cause of surgical failure in glaucoma. Since rosmarinic acid has antifibrotic action, we evaluate its usage as an adjunctive treatment to glaucoma filtration surgery. **Objectives:** To compare clinical, histopathological and expression of factors related to the healing process between rabbit underwent experimental glaucoma surgery (EGS) and treated with subconjunctival injections of rosmarinic acid or with saline solution 0.9%. **Methods:** Interventional experimental study (randomized clinical trial) in which 41 New Zealand rabbits were submitted to EGS in the right eye and divided into two treatment groups: group A (n=21) - eyes treated with subconjunctival injections of 0.1 ml of saline solution 0.9% and B (n=20) - eyes treated with subconjunctival injections of 0.1 ml of rosmarinic acid 15mg/ml (three days prior to surgery, at the end of surgery and every three days until euthanasia). Treatment effects were assessed after five days (groups A1 and B1) and 15 days (groups A2 and B2) by evaluation of intraocular pressure (IOP) with Tonopen and bleb characteristics based on the Moorfields Bleb Grading System, as well as histopathology analysis (neutrophil/field count; vessels/field count; collagen density after stained with Sirius Red; and anti- $\alpha$ -actin and anti-VEGF immunohistochemistry) and by RT-PCR (for collagen type 1 alpha 1 - COL1A1 and TGF- $\beta$ 2). The photomicrographs were evaluated quantitatively with ImageJ<sup>®</sup> 1.36 software (Sirius Red,  $\alpha$ -actin and VEGF) and data were compared through non-parametric tests, considering  $p < 0.05$  as statistically significant. **Results:** No significant difference was observed in IOP measurements between groups. Group B2 displayed significant higher scores of bleb central area ( $p=0.0004$ ), maximum area ( $p=0.0007$ ) and height ( $p=0.0239$ ). Both B1 ( $p < 0.0001$ ) and B2 ( $p=0.0011$ ) groups presented significantly lower vascularization scores than their respective controls. A significant decrease in neutrophils/field counting was observed only in group B2 ( $p=0.0159$ ), however vessels/field counting was significantly lower in groups B1 and B2, compared to their controls ( $p=0.0079$  and  $p=0.0345$ , respectively). No significant differences were observed in the collagen staining with Sirius Red and in the anti- $\alpha$ -actin immunohistochemistry between the all groups comparison, but group B1 displayed lower anti-VEGF measurement ( $p=0.0190$ ) than group A1. RT-PCR analysis for TGF- $\beta$ 2 and COL1A1 showed no difference between groups, except by group B2, which presented higher expression of COL1A1, compared to its control ( $p=0.0159$ ). **Conclusions:** The findings point to the potential anti-inflammatory and anti-neovascular effects of rosmarinic acid in glaucoma surgery. Although group B show better clinical aspect (except IOP, which showed no difference between groups), the antifibrotic action of rosmarinic acid could not be proved.

**Keywords:** Filtration surgery, Glaucoma, Neovascularization, Rosmarinic acid, Wound healing.

## ***Lista de Figuras***

---

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Correlação entre alterações estruturais (fotos superiores com o nervo óptico e a camada de fibras nervosas circunjacente) e funcionais (ilustrações inferiores com campos visuais correspondentes às fotos logo acima). A primeira foto ilustra nervo óptico e campo visual normais. Na segunda foto, com nervo óptico glaucomatoso, as setas identificam as lesões na camada de fibras nervosas (sinal de <i>Hoyt</i> ), sendo a lesão temporal superior, mais significativa, correspondendo à perda visual nasal inferior da perimetria. A terceira foto representa um caso avançado da doença (Adaptado de WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014)..... | 28 |
| <b>Figura 2:</b>  | Desenho ilustrativo do escoamento do humor aquoso via malha trabecular ou convencional <b>(A)</b> e via uveoescleral ou não convencional <b>(B)</b> (Adaptado de SCHIMITI; COSTA, 2013).....  | 30 |
| <b>Figura 3:</b>  | Montagem demonstrando as alterações anatômicas alcançadas por meio da TREC, evidenciando a nova via de drenagem do humor aquoso criada pela cirurgia <b>(A)</b> (Adaptado de JONES; SHETTY; SPAETH, 2008). A seta preta aponta para a ampola filtrante, vista ao final da cirurgia <b>(B)</b> (Adaptado de FELLMAN, 2009).....  | 35 |
| <b>Figura 4:</b>  | Esquema simplificado da cicatrização conjuntival (Adaptado de WELLS; WONG; CROWSTON, 2009) .....  | 41 |
| <b>Figura 5:</b>  | Representação simplificada da duração das etapas da cicatrização nos tecidos em geral (Adaptado de LOCKWOOD; BROCCINI; KHAW, 2013) .....  | 45 |
| <b>Figura 6:</b>  | Molécula do Ácido Rosmarínico (C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> ) (Adaptado de SIGMA ALDRICH, [sd.]).....   | 56 |
| <b>Figura 7:</b>  | Fotos dos <i>Eppendorfs</i> contendo as três concentrações propostas para o 1 <sup>a</sup> ensaio dose-resposta.....  | 64 |
| <b>Figura 8:</b>  | Fotos dos <i>Eppendorfs</i> contendo as três concentrações propostas para o 2 <sup>a</sup> ensaio dose-resposta.....  | 65 |
| <b>Figura 9:</b>  | Organograma da divisão dos grupos .....   | 66 |
| <b>Figura 10:</b> | Fotos <b>(A)</b> e <b>(B)</b> representativas do grupo A. Injeção subconjuntival aplicada três dias antes da cirurgia <b>(A)</b> e ao final da cirurgia <b>(B)</b> . Fotos <b>(C)</b> e <b>(D)</b> representativas do grupo B. Observar o aspecto externo da região de aplicação antes <b>(C)</b> e depois <b>(D)</b> da injeção subconjuntival de ácido rosmarínico, adquirindo esta coloração amarelada da suspensão <b>(seta)</b> .....  | 67 |

- Figura 11:** Fotos representativas do procedimento cirúrgico (Vide texto para detalhes do procedimento).....69
- Figura 12:** Fotografias demonstrando aspectos da ampola filtrante e do tubo de *sylastic* dos diversos grupos de estudo, ao dia da eutanásia. Notar tendência de ampola mais difusa e alta no grupo tratado B2 e ampolas menos vascularizadas nos grupos tratados B1 e B2 .....81
- Figura 13:** **(A)** evolução, no 15<sup>o</sup> DPO, de lesão à cápsula anterior do cristalino **(seta)**. **(B)** notar, no 3<sup>o</sup> DPO, a ampola filtrante mais elevada **(seta)** com vascularização aumentada, além da presença de sinéquia anterior ao redor do tubo. **(C)** presença de coágulo na base do tubo, próximo ao ângulo da câmara anterior, e o toque da extremidade distal do tubo no endotélio corneano. **(D)** evidência de coágulo na região distal do tubo (na câmara anterior). **(E)** presença de sinéquia anterior próxima à região distal de tubo **(seta)** .....82
- Figura 14:** Fotomicrografias da região limbar de dois animais do grupo A1 no 5<sup>o</sup> DPO. **(A)** sítio cirúrgico e o infiltrado inflamatório, além da presença de invaginação de tecido epitelial conjuntival **(seta)**. **(B)** sítio cirúrgico (ampla ampola filtrante) **(asterisco)**, além de menor infiltrado inflamatório e deposição inicial de colágeno (HE; magnificação original - 50x) .....83
- Figura 15:** Fotomicrografias de exemplos de campos histológicos do sítio cirúrgico, mostrando áreas adjacentes ao tubo de *sylastic* implantado. Notar importante depósito de colágeno corado em tons de vermelho nos diversos grupos do estudo (*Sirius Red*; magnificação original - 400x) .....87
- Figura 16:** Fotomicrografias da imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina do sítio cirúrgico, mostrando áreas adjacentes ao tubo de *sylastic* implantado. Notar marcação fibroblástica em tons de castanho nos diversos grupos do estudo (Magnificação original - 400x).....89
- Figura 17:** Coloração imuno-histoquímica para VEGF em áreas dentro dos sítios cirúrgicos. Notar maior número de fibroblastos e de células inflamatórias coradas no grupo A1 **(A)** do que no grupo B1 **(B)**. Uma invaginação do epitélio conjuntival é visível em **(A)**, com coloração muito fraca anti-VEGF **(asterisco)**. Material hialino (resíduos de ácido rosmarínico) é evidente em **(B)** **(setas)**. Podem ser observados achados semelhantes no grupo A2 **(C)** e no grupo B2 **(D)**, incluindo a presença de material hialino em **(D)** **(setas)** (Magnificação original - 400x) .....91

## ***Lista de Tabelas***

---

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> | Sequência de eventos da cicatrização e possíveis métodos de modulação da cicatrização na cirurgia filtrante do glaucoma (Adaptado de KHAW et al., 1994) .....   | 46 |
| <b>Tabela 2:</b> | Distribuição da mediana de escores $\pm$ erro padrão dos parâmetros avaliados relativos a características da ampola filtrante (de acordo com o <i>Moorfields Bleb Grading System</i> ) e média da fórmula $\Delta$ PIO $\pm$ erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos. A1 e B1 avaliados no 5º DPO; A2 e B2 avaliados no 15º DPO .....  | 81 |
| <b>Tabela 3:</b> | Distribuição da mediana $\pm$ erro padrão dos parâmetros estudados relativos a fatores envolvidos na fibrogênese tecidual (coloração por <i>Sirius Red</i> , imuno-histoquímica para $\alpha$ -actina e RT-PCR em tempo real para TGF- $\beta_2$ e COL1A1) e na angiogênese (imuno-histoquímica para VEGF e contagem de vasos/campo) da ampola de filtração nos diversos grupos de estudo. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos ..... | 92 |

## ***Lista de Gráficos***

---

- Gráfico 1:** Gráfico da comparação entre os grupos dos valores de PIO do OD obtidos no último dia de pós-operatório (n=41). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.....79
- Gráfico 2:** Valores de PIO do OD obtidos em cada grupo (média dos grupos para cada momento de aferição) que recebeu (B1, cinco dias e B2, 15 dias) ou não (A1, cinco dias e A2, 15 dias) o tratamento com ácido rosmarínico. Dados apresentados como média e erro padrão.....80
- Gráfico 3:** Distribuição dos valores de neutrófilos/campo na área cirúrgica dos olhos operados dos diversos grupos do estudo, ao dia da eutanásia (n=21). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. \* $p=0,0159$ . .....84
- Gráfico 4:** Distribuição da quantidade de vasos sanguíneos/campo na área cirúrgica dos olhos operados dos diversos grupos de estudo, ao dia da eutanásia (n=21). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. \*A1 vs B1:  $p=0,0079$ ; A2 vs B2:  $p=0,0345$ . .....85
- Gráfico 5:** Gráfico de comparação dos grupos demonstrando os valores (% área) obtidos pelo *software* ImageJ<sup>®</sup> 1.36 para quantificação de colágeno corado pelo *Sirius Red* (n=21). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.....86
- Gráfico 6:** Gráfico de comparação dos grupos demonstrando os valores (% área) obtidos pelo *software* ImageJ<sup>®</sup> 1.36 da coloração imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA) (n=20). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os

limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos .....88

**Gráfico 7:** Gráfico de comparação dos grupos demonstrando os valores (%área) obtidos pelo *software* ImageJ<sup>®</sup> 1.36 da coloração imuno-histoquímica para VEGF (n=19). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. \* $p=0,0190$ . .....90

**Gráficos 8:** Gráficos de comparação dos grupos demonstrando os valores obtidos pelo RT-PCR em tempo real para TGF- $\beta_2$  (**Gráfico 8A**) e para COL1A1 (**Gráfico 8B**) (n=20). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. \* $p=0,0159$ . .....93

## ***Lista de Símbolos e Abreviaturas***

---

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>5-FU-</b>     | 5-fluorouracil   |
| <b>AGIS-</b>     | <i>Advanced Glaucoma Intervention Study</i>                          |
| <b>ARVO-</b>     | <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>          |
| <b>BSA-</b>      | Albumina sérica bovina   |
| <b>CAGE-</b>     | Cirurgia antiglaucomatosa experimental                               |
| <b>CETEA-</b>    | Comissão de Ética em Experimentação Animal                           |
| <b>CIGTS-</b>    | <i>Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study</i>                |
| <b>COL1A1-</b>   | Colágeno tipo 1 alfa-1   |
| <b>CTGF-</b>     | Fator de crescimento do tecido conjuntivo                            |
| <b>DAB-</b>      | Diaminobenzidina   |
| <b>DMRI-</b>     | Degeneração macular relacionada à idade                              |
| <b>DPO-</b>      | Dia de pós-operatório  |
| <b>EGF-</b>      | Fator de crescimento epidérmico                                      |
| <b>EGS-</b>      | <i>Experimental glaucoma surgery</i>                                 |
| <b>EMGT-</b>     | <i>Early Manifest Glaucoma Treatment Trial</i>                       |
| <b>EPR-</b>      | Epitélio pigmentar da retina   |
| <b>FFSSG-</b>    | <i>Fluorouracil Filtering Surgery Study Group</i>                    |
| <b>FGF-</b>      | Fator de crescimento de fibroblasto                                  |
| <b>FMRP-USP-</b> | Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |
| <b>GAPDH-</b>    | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase                                |
| <b>GDx-</b>      | Polarímetro de varredura a LASER                                     |
| <b>GPAA-</b>     | Glaucoma primário de ângulo aberto                                   |
| <b>GPAF-</b>     | Glaucoma primário ângulo fechado                                     |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>HE-</b>                      | Hematoxilina & Eosina   |
| <b>HER2-</b>                    | Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2                            |
| <b>HRT-</b>                     | <i>Heidelberg Retina Tomograph</i>  |
| <b>IFN-<math>\gamma</math>-</b> | <i>Interferon-gama</i>  |
| <b>IGF-1-</b>                   | Fator de crescimento semelhante à insulina                                      |
| <b>IL-</b>                      | Interleucina  |
| <b>iNOS-</b>                    | Enzima óxido nítrico sintetase induzível  |
| <b>LASER-</b>                   | <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>                  |
| <b>MAPK-</b>                    | Proteína-quinase ativada por mitógeno   |
| <b>MCP-1-</b>                   | Proteína quimioatrativa de monócito-1   |
| <b>MEC-</b>                     | Matriz extracelular   |
| <b>MIP-</b>                     | Proteína inflamatória de macrófagos   |
| <b>MMC-</b>                     | Mitomicina C  |
| <b>mmHg-</b>                    | Milímetros de mercúrio  |
| <b>MMP-</b>                     | Metaloproteinases da matriz extracelular  |
| <b>OCT-</b>                     | Tomografia de coerência óptica (do inglês <i>Optical Coherence Tomography</i> ) |
| <b>OD-</b>                      | Olho direito  |
| <b>OE-</b>                      | Olho esquerdo   |
| <b>OHTS-</b>                    | <i>Ocular Hypertension Treatment Study</i>                                      |
| <b>PBS-</b>                     | <i>Phosphate buffered saline</i>  |
| <b>PDGF-</b>                    | Fator de crescimento derivado de plaquetas                                      |
| <b>Picro-sirius-</b>            | <i>Sirius Red</i> em ácido pícrico a 0,1%                                       |
| <b>PIO-</b>                     | Pressão intraocular   |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>RDP-</b>                     | Retinopatia diabética proliferativa                       |
| <b>RNA<sub>m</sub>-</b>         | RNA mensageiro  |
| <b>RT-PCR-</b>                  | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>    |
| <b>S1P-</b>                     | Esfingosina 1-fosfato                                     |
| <b>Skp2-</b>                    | Proteína quinase 2 interage com a fase S do ciclo celular |
| <b>STAT3-</b>                   | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3           |
| <b>TGF-<math>\beta</math>-</b>  | Fator de transformação do crescimento beta                |
| <b>TIMPs-</b>                   | Inibidores teciduais específicos das metaloproteinases    |
| <b>TNF-<math>\alpha</math>-</b> | Fator de necrose tumoral alfa                             |
| <b>TREC-</b>                    | Trabeculectomia   |
| <b>UA-</b>                      | Unidades arbitrárias                                      |
| <b>VEGF-</b>                    | Fator de crescimento vascular endotelial                  |
| <b><math>\alpha</math>-</b>     | Alfa  |
| <b><math>\beta</math>-</b>      | Beta  |

# SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>26</b>  |
| 1.1. Glaucoma .....   | 27         |
| 1.1.1. Epidemiologia .....  | 28         |
| 1.1.2. Fatores de risco .....   | 29         |
| 1.1.3. Fisiopatologia.....  | 30         |
| 1.1.4. Diagnóstico .....  | 32         |
| 1.1.5. Classificação.....   | 33         |
| 1.1.6. Tratamento.....  | 33         |
| 1.1.7. Trabeculectomia (TREC).....  | 35         |
| 1.1.8. Modelos de estudo da cirurgia antiglaucomatosa.....                      | 38         |
| 1.2. O processo cicatricial .....   | 40         |
| 1.2.1. Drogas moduladoras da cicatrização .....                                 | 47         |
| 1.3. Ácido rosmarínico.....   | 55         |
| 1.4. Justificativa .....  | 58         |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>59</b>  |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODO.....</b>  | <b>61</b>  |
| 3.1. Desenho do estudo .....  | 62         |
| 3.2. Animais .....  | 62         |
| 3.3. Forma de apresentação, via de utilização e dose do ácido rosmarínico ..... | 62         |
| 3.4. Estudo piloto .....  | 63         |
| 3.5. Grupos de estudo .....   | 65         |
| 3.6. Procedimentos experimentais .....  | 66         |
| 3.7. Parâmetros clínicos .....  | 70         |
| 3.8. Avaliação histológica .....  | 71         |
| 3.9. Avaliação imuno-histoquímica .....   | 71         |
| 3.10. Expressão gênica por RT-PCR em tempo real .....                           | 73         |
| 3.11. Estudo morfométrico.....  | 74         |
| 3.12. Análise estatística .....   | 76         |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>  | <b>77</b>  |
| 4.1. Parâmetros clínicos.....   | 78         |
| 4.2. Complicações .....   | 82         |
| 4.3. Avaliação histológica.....   | 83         |
| 4.4. Avaliação imuno-histoquímica.....  | 87         |
| 4.5. Expressão gênica por RT-PCR em tempo real.....                             | 91         |
| <b>5.DISSCUSSÃO .....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                       | <b>103</b> |
| <b>8. ANEXOS .....</b>  | <b>122</b> |
| <b>ANEXO DE PUBLICAÇÃO</b>  |            |

## ***1- Introdução***

---

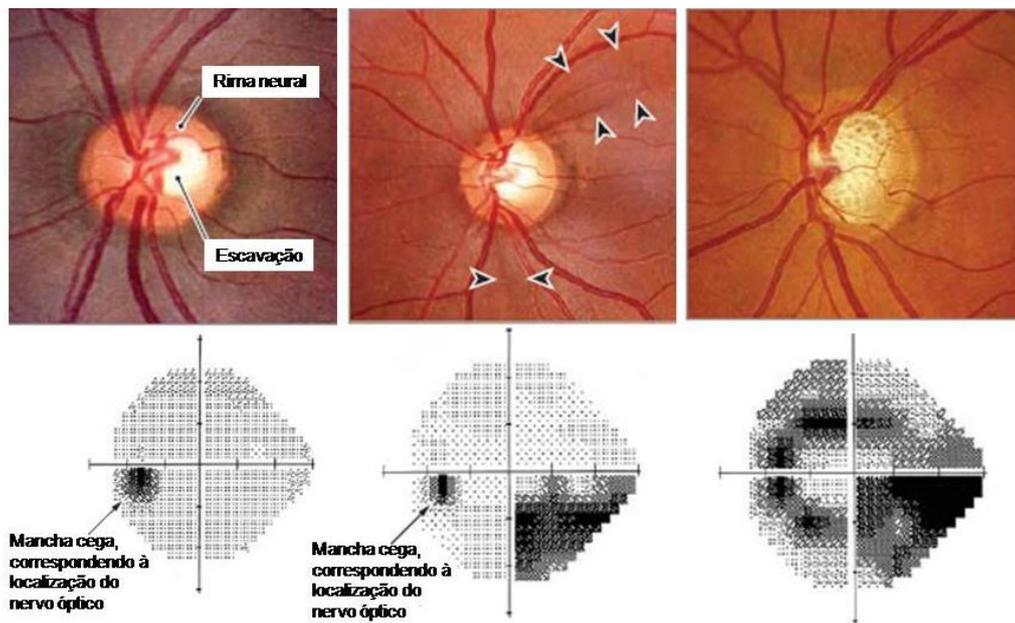
---

A cicatrização subconjuntival excessiva é a maior causa de falha cirúrgica no glaucoma e está relacionada ao mau funcionamento da ampola filtrante (CORDEIRO et al., 2000a; KHAW et al., 2001). O uso dos agentes locais antiproliferativos atualmente disponíveis, o 5-fluorouracil (5-FU) e a mitomicina C (MMC), voltados ao controle da cicatrização pós-operatória, é limitado pelo risco de complicações cirúrgicas que podem levar à cegueira, tais como: vazamento da ampola filtrante, hipotonia e endoftalmite infecciosa (FRANKS; HITCHINGS, 1991; HIGGINBOTHAM et al., 1996; JAMPEL; PASQUALE, 1992).

Diante dessas dificuldades e da necessidade de novas opções de drogas moduladoras da cicatrização, a quantidade de estudos visando a descoberta de novos fármacos para o tratamento adjuvante em cirurgias filtrantes do glaucoma vem crescendo nos últimos anos, abrindo perspectiva para a pesquisa de novos agentes moduladores (ARSLAN et al., 2012; LÜKE et al., 2010; LUKOWSKI et al., 2013; MIN et al., 2012b; RIBEIRO, 2011; TURGUT et al., 2014, 2015; ZHONG et al., 2011).

## **1.1 Glaucoma**

O glaucoma pode ser descrito como um grupo de doenças oculares de etiologia multifatorial, correlacionadas por uma neuropatia óptica característica, potencialmente progressiva, que apresenta mudanças, geralmente típicas, na cabeça do nervo óptico, representativas da degeneração de axônios das células ganglionares da retina, potencialmente associadas à deformação da lâmina crivosa (CASSON et al., 2012). Transcorre com perda no campo visual correspondente, muitas vezes imperceptíveis ao paciente nos estágios iniciais da doença (Figura 1). Enquanto a acuidade visual é inicialmente poupada, a progressão pode levar à completa perda de visão (CASSON et al., 2012).



**Figura 1:** Correlação entre alterações estruturais (fotos superiores com o nervo óptico e a camada de fibras nervosas circunjacente) e funcionais (ilustrações inferiores com campos visuais correspondentes às fotos logo acima). A primeira foto ilustra nervo óptico e campo visual normais. Na segunda foto, com nervo óptico glaucomatoso, as setas identificam as lesões na camada de fibras nervosas (sinal de *Hoyt*), sendo a lesão temporal superior, mais significativa, correspondendo à perda visual nasal inferior da perimetria. A terceira foto representa um caso avançado da doença (Adaptado de WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

### 1.1.1 Epidemiologia

O glaucoma é a terceira causa de cegueira no mundo (8%), atrás da catarata com 51% e das causas indeterminadas com 21% (PASCOLINI; MARIOTTI, 2012). Muito embora as causas de cegueira variem de acordo com as condições socioeconômicas e geográficas da população avaliada, o glaucoma se mantém como uma das principais causas (RESNIKOFF et al., 2004). É considerado a principal causa de cegueira irreversível no mundo, sendo foco de muitas pesquisas na área de oftalmologia e neurociência (CASSON et al., 2012; DANDONA L.; DANDONA R., 2006; QUIGLEY, 1996). A sua prevalência varia de acordo com a população analisada. No Brasil, em estudo avaliando indivíduos acima de 40 anos, observou-se taxa de 3,4% (SAKATA et al., 2007). Na maioria dos casos, a doença se mantém

---

assintomática. Levantamentos populacionais sugerem que apenas 10% a 50% das pessoas com glaucoma sabem que são portadoras (BUDENZ et al., 2013; HENNIS et al., 2007; LEITE; SAKATA; MEDEIROS, 2011; ROTCHFORD et al., 2003; SATHYAMANGALAM et al., 2009). Estima-se que, em 2020, haverá 79,6 milhões de pessoas com glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA) e de ângulo fechado (GPAF), sendo a maioria (74%) portadora do GPAA, e que 5,9 milhões de pessoas estarão cegas bilateralmente por GPAA e 5,3 milhões por GPAF (QUIGLEY; BROMAN, 2006).

### 1.1.2 Fatores de risco

Diversos fatores de risco foram associados ao glaucoma. Segundo o *Ocular Hypertension Treatment Study* (OHTS), a idade, a relação escavação/disco óptico vertical, as alterações no campo visual, a pressão intraocular (PIO) e a espessura central da córnea foram os principais fatores relacionados à evolução de hipertensão ocular para glaucoma (GORDON et al., 2002; KASS et al., 2002).

O *Early Manifest Glaucoma Treatment Trial* (EMGT) demonstrou como fatores preditivos de progressão do glaucoma: PIO elevada, idade avançada, presença de hemorragia na cabeça do nervo óptico, exfoliação no cristalino, ambos os olhos envolvidos e alterações avançadas no campo visual (HEIJL et al., 2002; LESKE et al., 2003).

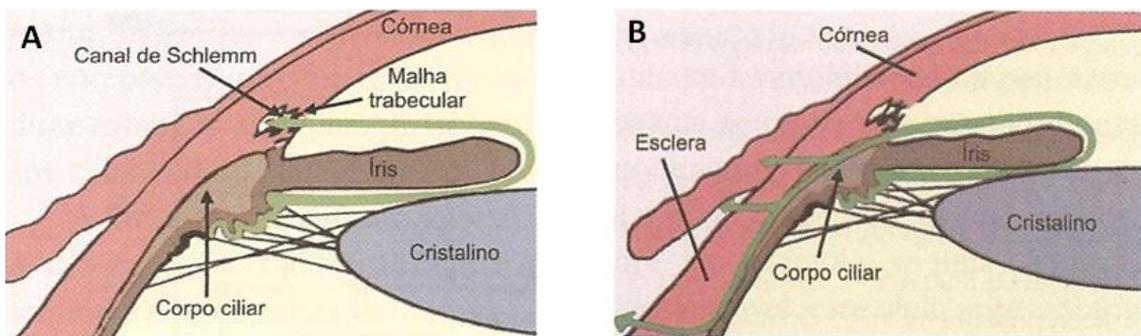
Os principais fatores de risco envolvidos na incidência do GPAA no *Barbados Eye Study Group* foram: raça negra, idade avançada, maior PIO, história familiar, fatores vasculares (incluindo baixa pressão sanguínea sistólica e, particularmente, baixa pressão de perfusão ocular) e espessura central da córnea mais fina (LESKE et al., 2008).

A PIO elevada, embora possa fazer parte da definição do glaucoma, é um dos fatores de risco mais consistentemente identificados dentre os associados ao glaucoma. Além disto, é o mais relevante deles porque é o único sobre o qual se pode atuar terapêuticamente com eficácia, em termos de prevenção de perdas visuais (AGIS INVESTIGATORS, 2000; GORDON et al.,

2002; HEIJL et al., 2002; KASS et al., 2002; LESKE et al., 2003, 2008; NOURI-MAHDAVI et al., 2004).

### 1.1.3 Fisiopatologia

Embora a fisiopatologia do glaucoma não seja completamente compreendida, o nível de PIO está relacionado com a morte das células ganglionares da retina. A PIO é determinada pelo equilíbrio entre a produção de humor aquoso pelo corpo ciliar e a sua drenagem através de duas vias independentes (via malha trabecular e via uveoescleral) (Figura 2). A elevação da PIO pode ocorrer por resistência de drenagem na malha trabecular (como o que ocorre no GPAA) ou por obstrução pela íris ao acesso à via trabecular (como acontece no GPAF), sendo a via trabecular considerada a via principal de drenagem do humor aquoso (WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014; BILL; HELLSING, 1965; SEIDEL, 1921).



**Figura 2:** Desenho ilustrativo do escoamento do humor aquoso via malha trabecular ou convencional **(A)** e via uveoescleral ou não convencional **(B)** (Adaptado de SCHIMITI; COSTA, 2013).

---

A PIO elevada pode causar estresse mecânico sobre as estruturas do pólo posterior do olho, sobretudo a lâmina crivosa e os tecidos adjacentes. Esse estresse leva à deformação e ao remodelamento da lâmina crivosa, com conseqüente dano aos axônios do nervo óptico que aí se encontram (dano mecânico axonal e interrupção do transporte axonal retrógrado de fatores tróficos essenciais para as células ganglionares da retina), levando aos achados fundoscópicos característicos da doença como, por exemplo, o aumento da escavação do nervo óptico, a diminuição da rima neural, localizada ou generalizada, e o sinal de *Hoyt* (Figura 1) (BURGOYNE et al., 2005; FECHTNER; WEINREB, 1994).

A neuropatia óptica glaucomatosa, que ocorre em indivíduos com PIO considerada dentro da normalidade (denominado de glaucoma de pressão normal), não está completamente esclarecida em termos fisiopatológicos. Pode ser decorrente de baixa pressão do fluido cérebroespinal nas imediações do espaço subaracnoide do nervo óptico, resultando em elevado gradiente de pressão ao longo da lâmina crivosa. A microcirculação prejudicada, alteração da imunidade, excitotoxicidade e o estresse oxidativo também podem estar envolvidos na fisiopatologia do glaucoma (ALMASIEH et al., 2012; WANG et al., 2012).

O glaucoma apresenta grande heterogeneidade genética. Alterações em diferentes genes podem levar ao mesmo fenótipo, enquanto que variantes no mesmo gene podem levar a diferentes fenótipos (ELMALLAH; ALLINGHAM, 2009). Até o momento, 25 *loci* foram associados ao GPAA e, destes, apenas os genes *MYOC*, *OPTN* e *WDR36* foram identificados (RAY; MOOKHERJEE, 2009). O padrão de herança predominante é o poligênico multifatorial, no entanto, casos de herança mendeliana já foram descritas (TAKAMOTO; ARAIE, 2014).

#### 1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser realizado durante o exame oftalmológico de rotina, associado a exames complementares, sendo consideradas fundamentais as seguintes ferramentas semiológicas:

- A tonometria (medida da PIO): o método de aplanção da córnea é o mais utilizado, com aferição apresentada em milímetros de mercúrio (mmHg) (tonômetro de *Goldman*, considerado padrão ouro, e os aparelhos portáteis, como o *Perkins* e o *Tonopen*) (HAMARD, 2010; KOTTECHA; LIM; GARWAY-HEATH, 2009).
- A gonioscopia, para a observação do ângulo da câmara anterior. Importante passo para a classificação da doença (HAMARD, 2007; SALMON, 2009).
- A avaliação fundoscópica, para investigação de mudanças estruturais na cabeça do nervo óptico (JONAS, 2009; JONAS; BUDDE; PANDA-JONAS, 1999).

Os exames complementares, comumente utilizados na investigação diagnóstica do glaucoma, visam a avaliação funcional e estrutural do dano glaucomatoso. A perimetria computadorizada, para apreciação do campo visual, é o padrão ouro para acompanhamento e investigação da progressão da doença. É considerado o principal exame voltado à análise funcional do comprometimento glaucomatoso (Figura 1, imagens inferiores) (NOURI-MAHDAVI et al., 2011; TATHAM; WEINREB; MEDEIROS, 2014).

São ferramentas empregadas para a análise estrutural do dano glaucomatoso: a retinografia (documentação do nervo óptico por meio de fotografias ou estereofotografias) (Figura 1, imagens superiores); a tomografia de coerência óptica (OCT - *Optical Coherence Tomography*, faz avaliação quantitativa da espessura da camada de fibras nervosas da retina e da cabeça do nervo óptico, ferramenta importante para o diagnóstico precoce); o tomógrafo de varredura a LASER (HRT - *Heidelberg Retina Tomograph*), um topógrafo que reconstrói por planos o disco óptico; e o polarímetro de varredura

a LASER (GDx), que mede a espessura da camada de fibras nervosas da retina peripapilar por polarimetria, esses dois últimos também fornecem a análise quantitativa (NOURI-MAHDAVI; CAPRIOLI, 2014; TATHAM; WEINREB; MEDEIROS, 2014).

A paquimetria é um importante exame complementar utilizado para a medida da espessura central da córnea. É importante na propedêutica do glaucoma pois, de modo geral, córneas espessas podem hiperestimar e as finas hipoesimar a medida da PIO (DOUGHTY; ZAMAN, 2000; MEDEIROS et al., 2003).

### 1.1.5 Classificação

O glaucoma pode ser classificado, de acordo com a etiologia, em primário (a causa para o glaucoma não é identificada) ou secundário (fator causal conhecido). De acordo com o aspecto anatômico do seio cameral, o glaucoma pode ser denominado aberto, fechado ou congênito. Segundo a evolução clínica da doença, classifica-se, ainda, em agudo (início abrupto e sintomatologia, por vezes, exuberante) ou crônico (início insidioso com evolução lenta e, na maioria dos casos, assintomático) (CASSON et al., 2012; PAULA, 2012). Maiores detalhes e outras classificações não serão apresentadas aqui, mas são importantes para o correto diagnóstico e tratamento dos pacientes (CASSON et al., 2012; FOSTER et al., 2002).

### 1.1.6 Tratamento

Segundo a Academia Americana de Oftalmologia, e outros consensos disponíveis, recomenda-se reduzir a PIO para um nível alvo (PIO ALVO), que é um valor ou intervalo de valores em que se considera que a taxa de progressão da doença será retardada o suficiente para evitar o comprometimento funcional pela doença (AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, 2010; EUROPEAN GLAUCOMA SOCIETY, 2008; SOCIEDADE BRASILEIRA DE GLAUCOMA, 2009). A PIO ALVO é estabelecida a partir do nível de PIO antes

---

do tratamento (PIO BASAL), a gravidade dos danos, fatores de risco para a progressão, a expectativa de vida do paciente e potenciais efeitos adversos ao tratamento. Em geral, o alvo inicial sugere redução de 20% a 50% na PIO BASAL. No entanto, a PIO ALVO precisa ser continuamente reavaliada durante o acompanhamento do paciente, podendo ser ajustada de acordo com a progressão da doença (AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, 2010; CLEMENT; BHARTIYA; SHAARAWY, 2014).

Na maioria dos casos, o tratamento clínico é suficiente para o controle da doença. São utilizados, inicialmente, colírios de instilação diária e contínua, em monoterapia, evoluindo para associação de colírios, de acordo com as especificidades de cada paciente. Nos casos agudos, em que os colírios não são suficientes para baixar a PIO, ainda utilizam-se medicamentos de uso oral (acetazolamida) ou endovenoso (manitol), por curto período de tempo. As classes farmacológicas, atualmente disponíveis comercialmente para uso tópico, são: os colinérgicos, os beta ( $\beta$ ) - bloqueadores, os alfa ( $\alpha$ ) - agonistas, os inibidores da anidrase carbônica e os análogos da prostaglandina. Os mecanismos de ação são variáveis, todos agindo com a finalidade de diminuir a PIO visando, dessa forma, impedir a progressão do glaucoma (AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, 2010; CLEMENT; BHARTIYA; SHAARAWY, 2014).

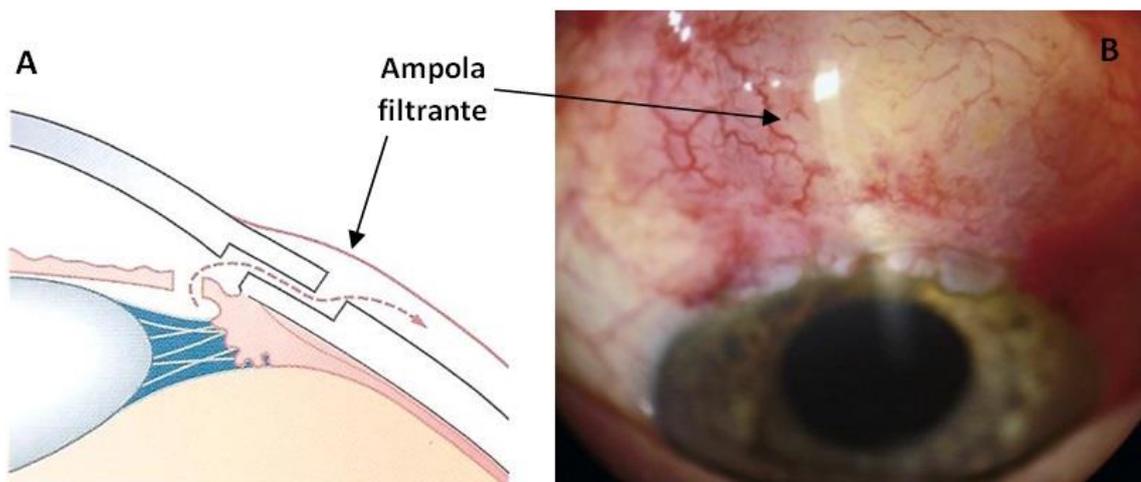
A PIO ALVO deve ser alcançada com o mínimo de medicamentos e efeitos colaterais. A escolha da droga pode ser influenciada pela eficácia, custo, efeitos adversos e esquemas de dosagem. Quando o tratamento clínico não alcançar a PIO ALVO, a cirurgia, a LASER ou incisional, está indicada (AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, 2010; WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

As técnicas a LASER mais comumente realizadas são: a trabeculoplastia (GLAUCOMA LASER TRIAL RESEARCH GROUP, 1995), a iridoplastia (NG; ANG; AZUARA-BLANCO, 2012), a iridotomia (CUMBA et al., 2013) e a ciclotocoagulação, por via transescleral ou por via endoscópica (ISHIDA, 2013), cada qual com indicações específicas.

Atualmente, existem algumas opções de técnicas cirúrgicas incisionais para o glaucoma. A goniotomia e a trabeculotomia são procedimentos não fistulizantes, empregados no tratamento do glaucoma congênito (SHARAAWY; BHARTIYA, 2011). A viscocanalostomia, a canaloplastia, a esclerectomia profunda não penetrante (ELDALY et al., 2014; RULLI et al., 2013; WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014) e os implantes de drenagem são técnicas utilizadas como alternativa à trabeculectomia (TREC). Todavia, a TREC ainda é a modalidade cirúrgica mais empregada no tratamento do glaucoma (SHARAAWY; BHARTIYA, 2011; WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

### 1.1.7 Trabeculectomia (TREC)

Segundo Mello e Teixeira (2013), “a TREC é uma cirurgia fistulizante (a fístula comunica a região intraocular com a extraocular), também denominada filtrante (o humor aquoso é redirecionado para a região subtenoniana, onde vai ser absorvido, ou seja, filtrado, alcançando a circulação venosa)” (Figura 3).



**Figura 3:** Montagem demonstrando as alterações anatômicas alcançadas por meio da TREC, evidenciando a nova via de drenagem do humor aquoso criada pela cirurgia (A) (Adaptado de JONES; SHETTY; SPAETH, 2008). A seta preta aponta para a ampola filtrante, vista ao final da cirurgia (B) (Adaptado de FELLMAN, 2009).

---

A TREC foi descrita pela primeira vez em 1968 por John Edward Cairns (CAIRNS, 1968). À época, a nova cirurgia mostrou-se superior às antigas por promover o restabelecimento mais precoce da câmara anterior, com menor taxa de complicações no pós-operatório. Desde então, várias modificações da técnica original surgiram. Foi aperfeiçoada, a partir de 1982, com o uso de antimetabólitos como o 5-FU e a MMC, e tecnicamente modificada por Peng Khaw a partir de 2000 tornando-se, assim, um procedimento mais seguro e eficaz (ALMEIDA; COHEN, 2008; CAIRNS, 1968; KHAW; WELLS, 2001).

Preferencialmente, opta-se pelos sítios cirúrgicos localizados nas regiões conjuntivais superior, nasal ou temporal do globo ocular. A sutura de tração corneana expõe a região a ser operada, de forma que a dissecação da conjuntiva seja extensa, realizando o retalho conjuntival de base fórnice. Depois de adequada cauterização dos vasos, um retalho escleral de base límbica é confeccionado com parte da espessura escleral, de forma que o fluxo de humor aquoso seja direcionado posteriormente. A aplicação de MMC nas concentrações de 0,2 a 0,4 mg/ml é recomendada durante um a três minutos, personalizada para cada caso. A TREC (ou seja, a retirada em bloco de toda a espessura da esclera e do trabeculado, deixando pequeno orifício comunicando a câmara anterior do olho com a região externa do mesmo) é realizada, seguida pela iridectomia periférica e, então, pelas suturas esclerais ajustadas no retalho escleral e a conjuntiva suturada para formação da ampola filtrante (SHARAAWY; BHARTIYA, 2011). Ainda pode ser realizado um retalho escleral retangular com duas suturas fixas nas bordas e ser colocada substância viscoelástica para manter a câmara anterior. Mesmo com os cuidados descritos, a quantidade de filtração do humor aquoso é variável. A hiperfiltração pode resultar numa câmara anterior rasa, maculopatia hipotônica, descolamento ou hemorragia da coroide e catarata (EDMUNDS et al., 2002). A necessidade de massagem ocular ou lise de sutura são, por vezes, necessárias para obter uma baixa PIO pós-operatória. Esta lise de sutura não é previsível em termos de resultado, algumas vezes impossível de realizar e pode resultar em drenagem excessiva e hipotonia subsequente. A câmara anterior rasa e a hipotonia durante a cirurgia aumentam o risco de

---

complicações como: hemorragia de coroide, descompensação corneana e piora visual (STALMANS et al., 2006).

A TREC preconizada por Peng Khaw implica no uso de suturas removíveis e ajustáveis, um mantenedor de câmara anterior e a utilização do *punch* para a realização da TREC. Esta técnica tem várias vantagens. A utilização do *punch* produz uma abertura padrão, após a TREC, e o ajustamento pós-operatório das suturas permite melhor controle da filtração. Durante a cirurgia, a câmara anterior é mantida por irrigação contínua de solução salina balanceada. Dessa forma, a hipotonia é evitada. De modo geral, esta nova técnica pode apresentar resultado melhor e mais seguro após a cirurgia filtrante (STALMANS et al., 2006; WELLS; BUNCE; KHAW, 2004). Ela foi avaliada em longo prazo e a taxa de complicações pós-operatórias foi rara: câmara anterior rasa (1,8%), vazamento da ampola (0%), hipotonia (1,5%) e descolamento de coroide (8,9%) (STALMANS et al., 2006).

O uso de antifibróticos (a saber, o 5-FU e a MMC) está associado com maior incidência de complicações, mas evitar o seu uso pode resultar em taxa mais elevada de insucesso, em curto prazo (SHARAAWY; BHARTIYA, 2011). Os resultados do *Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study* (CIGTS) indicaram que a TREC, com ou sem o uso de antifibróticos, era equivalente à terapia medicamentosa para o GPAA em cinco anos de acompanhamento. Embora a TREC tenha demonstrado níveis mais baixos de PIO do que o tratamento a LASER e a terapia medicamentosa, não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação de progressão no campo visual (LICHTER et al., 2001).

O *Advanced Glaucoma Intervention Study* (AGIS) avaliou, em longo prazo, pacientes com glaucoma avançado que não alcançavam o controle medicamentoso, comparando os resultados de duas sequências de tratamentos cirúrgicos. Uma sequência começou com a trabeculoplastia a LASER, seguida pela TREC e por uma segunda TREC, se houvesse falhas subsequentes. A outra sequência começou com a TREC, seguida pela trabeculoplastia a LASER e por uma segunda TREC, na existência de falhas (EDERER; GAASTERLAND; SULLIVAN, 1994). Os dados do AGIS sobre a

---

perda de campo visual, perda de acuidade visual, PIO elevada e taxa de falha das intervenções cirúrgicas iniciais sugerem a hipótese de que uma intervenção inicial com a TREC retardaria a progressão do glaucoma de forma mais eficaz nos olhos dos pacientes de raça branca, comparado com os de raça negra. Enquanto que a intervenção inicial com a trabeculoplastia a LASER poderia ser mais eficaz para os pacientes de raça negra (AGIS INVESTIGATORS, 1998, 2001).

A taxa de sucesso da TREC depende não somente do tipo de glaucoma, mas também da raça, idade, cirurgias oculares prévias e presença de outras doenças oftalmológicas. Esses fatores de risco parecem estimular maior fibrose conjuntival pós-TREC. Pacientes idosos usualmente tem maior taxa de sucesso do que os jovens. Indivíduos da raça negra, e em menor grau hispânicos, tem menor taxa de sucesso do que os caucasianos. O resultado é melhor em olhos que nunca foram submetidos a cirurgias. Glaucomas secundários, como o neovascular, traumático ou inflamatório, aumentam a taxa de insucesso da TREC (HAWKER; BROADWAY, 2009; KHAW et al., 2001).

Na TREC, um pós-operatório cuidadoso é fundamental para o sucesso e pode ser mais desafiador que o próprio procedimento, uma vez que a técnica ainda está associada a um grande número de complicações (HAYNES; ALWARD, 1999).

### **1.1.8 Modelos de estudo da cirurgia antiglaucomatosa**

Um protocolo experimental, qualquer que seja, implica na interação de agentes, sejam eles físicos, químicos ou biológicos (cultura de células, órgãos isolados e animais). O modelo animal a ser escolhido deve ser aquele que melhor responda ao experimento, possibilite sua reprodução de maneira que qualquer pesquisador possa ter acesso aos mesmos resultados e permita transposição dos seus achados para estudos mais complexos ou aplicados (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; PINTO; ROCHA, [s.d.]).

Alguns poucos modelos experimentais no glaucoma utilizam macacos, em que se realiza a TREC convencional, com indução ou não do glaucoma nos

---

olhos desses animais, antes do procedimento cirúrgico. A avaliação pós-operatória é realizada semelhante à avaliação clínica em humanos, em alguns estudos procedendo-se a enucleação do olho para análise histológica do sítio cirúrgico e para a cultura de células (BAIR; CHEN, 1997; HERSCHLER, 1990; PASQUALE et al., 1992; YE et al., 2010).

Alguns animais mais distantes do homem podem apresentar grau de semelhança suficiente para serem usados em pesquisas no glaucoma. Considerados animais de laboratório (camundongos, ratos, *hamsters*, cobaias e coelhos), são de fácil manutenção e observação, permitindo que se trabalhe com uma amostra maior. Dessa forma, são mais comumente utilizados nos estudos experimentais intervencionistas (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; PINTO; ROCHA, [s.d.]).

Os modelos de cirurgia filtrante em camundongos diferem do humano por não haver a confecção de retalho escleral, uma vez que a esclera desses animais é muito fina. A técnica simplificada envolve a formação da ampola cirúrgica através da dissecação conjuntival e criação de fístula com a ajuda de uma agulha que perfaz a comunicação da câmara anterior com o espaço subconjuntival. Experimentos envolvendo esses animais se tornam vantajosos pela grande disponibilidade de reagentes essenciais, como os anticorpos utilizados na avaliação histopatológica da cicatrização conjuntival; além da facilidade de investigação da terapia genética, uma vez que o genoma do camundongo já foi mapeado e sequenciado (SEET et al., 2011).

Em ratos existe o modelo de cirurgia fistulizante semelhante ao realizado em coelhos, mais próximo do realizado em humanos, através da implantação de um tubo de silicone que drena o humor aquoso para o espaço subconjuntival, resultando em uma ampola de filtração suficientemente mais longa para caracterizar a falência cirúrgica (SHERWOOD et al., 2004).

O coelho tem sido o animal mais extensivamente utilizado para o estudo da resposta cicatricial da cirurgia fistulizante do glaucoma, sob o ponto de vista clínico e histológico, devido ao custo-efetividade e à estrutura ocular relativamente grande, facilitando a manipulação cirúrgica (SEET et al., 2011). Cordeiro et al. (1997) descreveram um novo modelo de cirurgia filtrante no

---

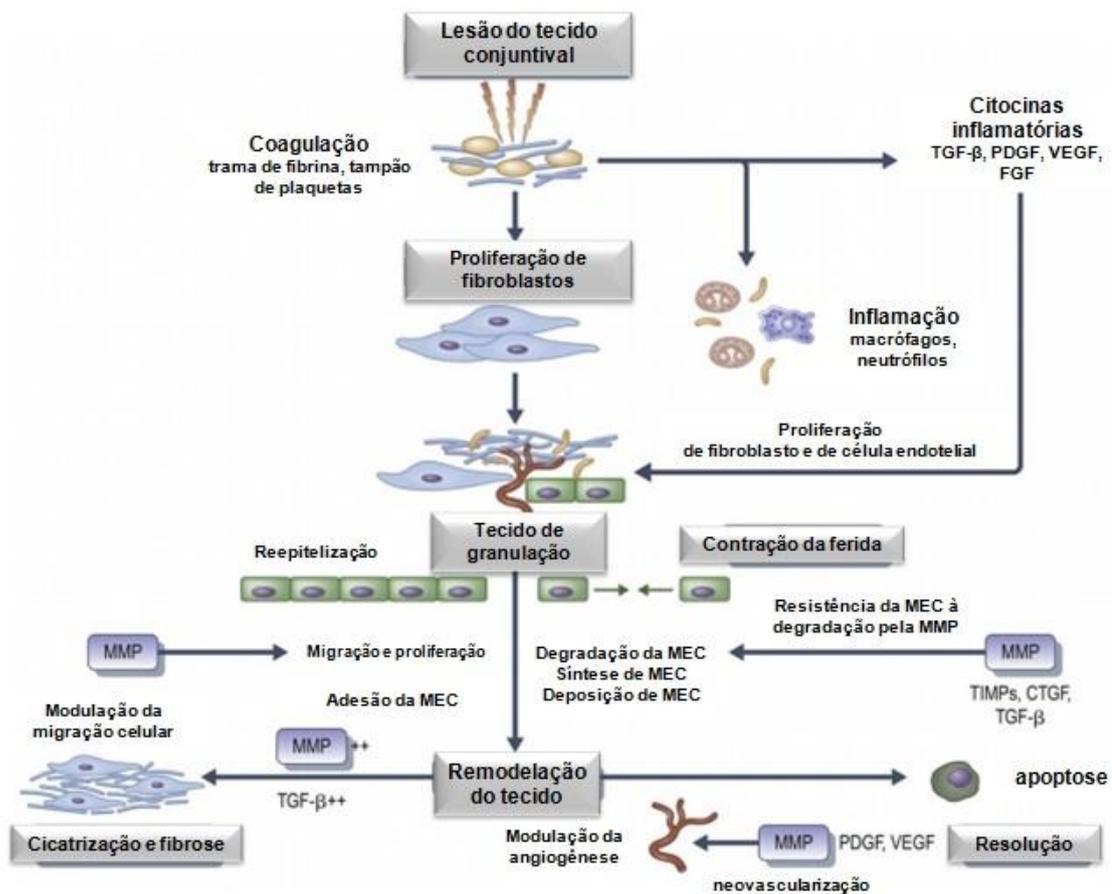
coelho. Este modelo foi projetado para investigar especificamente a resposta cicatricial do tecido subconjuntival, mantendo a esclerotomia patente com o auxílio de uma cânula de plástico de 22-gauge, anulando, assim, o efeito da cicatrização escleral e direcionando a área de tratamento da droga estudada para a superfície interna da conjuntiva.

Comparando com os humanos, o processo cicatricial em coelhos é mais agressivo e a falência da ampola filtrante é mais precoce, geralmente dentro de 15 dias após a cirurgia, se não há aplicação de antimetabólitos. Portanto, tratamentos que modulam a cicatrização em coelhos devem ser benéficos em seres humanos, que geralmente têm uma resposta cicatricial menos pronunciada (SHERWOOD et al., 2004). No entanto, alguns aspectos da cirurgia fistulizante não podem ser examinados detalhadamente nestes animais, pela relativamente limitada disponibilidade de reagentes, medicamentos e outros materiais específicos e de arranjos voltados ao estudo da expressão dos genes (SEET et al., 2011).

## 1.2 O processo cicatricial

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e interativo envolvendo mediadores solúveis, células sanguíneas, matriz extracelular (MEC) e células parenquimatosas (LOCKWOOD; BROCCINI; KHAW, 2013; SINGER; CLARK, 1999). Consiste em uma série de eventos que se sobrepõem, destacando as seguintes fases: coagulação, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009) (Figuras 4 e 5). O conteúdo presente na descrição de cada subitem a seguir se baseou na descrição de Lama e Fechtner (2003), Seibold, Sherwood e Kahook (2012) e Wells, Wong e Crowston (2009) sobre o processo cicatricial na cirurgia do glaucoma, complementado com a descrição de Kumar, Abbas e Fausto (2005) a respeito da cicatrização dos tecidos em geral. Não estão apresentados abaixo detalhes relacionados à primeira fase, de lesão tecidual,

os quais estão relacionados à cirurgia, discutida durante este texto. Iniciou-se, assim, a descrição de eventos que se seguem a esta fase.



**Figura 4:** Esquema simplificado da cicatrização conjuntiva (Adaptado de WELLS; WONG; CROWSTON, 2009).

**A) Coagulação:** a incisão dos vasos leva ao escape de células do sangue, plaquetas e proteínas do plasma, incluindo a fibrina, a fibronectina e o plasminogênio. Hormônios locais tais como a histamina, a serotonina, as prostaglandinas e os leucotrienos também são liberados no local. Esses fatores podem modificar a permeabilidade vascular, bem como aumentar e regular a resposta inflamatória. Eles também têm um impacto significativo sobre a

---

atividade dos fibroblastos em fases posteriores da cicatrização. As plaquetas começam a agregar no local da lesão e, uma vez ativadas, desempenham papel crucial nas etapas posteriores da cicatrização, através da liberação de várias substâncias químicas e fatores de crescimento. Dentre essas, a serotonina, o tromboxano A<sub>2</sub>, a trombina e o fator de ativação plaquetária servem para perpetuar o processo de coagulação. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) têm papéis importantes na futura deposição de colágeno e na angiogênese. As quimiocinas e as citocinas também são liberadas para servir como potentes quimioatratadores inflamatórios, tais como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta_1$  e TGF- $\beta_2$ ), a interleucina (IL-1 e IL-8) e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 $\alpha$  e MIP-2). O fator plaquetário 4, também liberado em grande quantidade pelas plaquetas, funciona como uma proteína quimiotática para monócitos e neutrófilos e também tem atividade imunorreguladora. Ao mesmo tempo, os fatores de coagulação são ativados e a cascata de coagulação progride até a conversão, mediada pela trombina, de fibrinogênio em fibrina, evoluindo para a formação de um coágulo progressivamente estável pelas ligações cruzadas no tampão plaquetário.

**B) Inflamação:** é iniciada pela chegada de neutrófilos e monócitos no local da ferida. Os neutrófilos são encontrados no tecido subconjuntival minutos após a lesão, com um pico em torno de 48 horas. Quando ativados, liberam enzimas proteolíticas, colagenase e elastase, auxiliando, dessa forma, sua penetração através da membrana basal endotelial. Eles fagocitam bactérias e partículas estranhas e, conseqüentemente, limpam a ferida através da digestão da MEC, mediada por proteases. Os monócitos diferenciam-se em

macrófagos, amplamente na presença de TGF- $\beta$ . Os macrófagos ativados, além da fagocitose ajudando no debridamento do tecido, também desempenham papel fundamental na regulação da cicatrização, produzindo uma variedade de citocinas e fatores de crescimento [PDGF, TGF- $\beta$ , fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF)] e interagem com os linfócitos e fibroblastos. Os macrófagos são necessários para a adequada ativação dos fibroblastos. Outra célula inflamatória essencial, o linfócito T, que chega por volta do quinto dia, desempenha dupla função na regulação da cicatrização de feridas. No início do período inflamatório, os linfócitos T estimulam os fibroblastos, os macrófagos e as células endoteliais, enquanto que, em fases posteriores, diminui a atividade dessas células. As citocinas liberadas pelo linfócito T incluem PDGF, TGF- $\beta$ , IL-4 e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ).

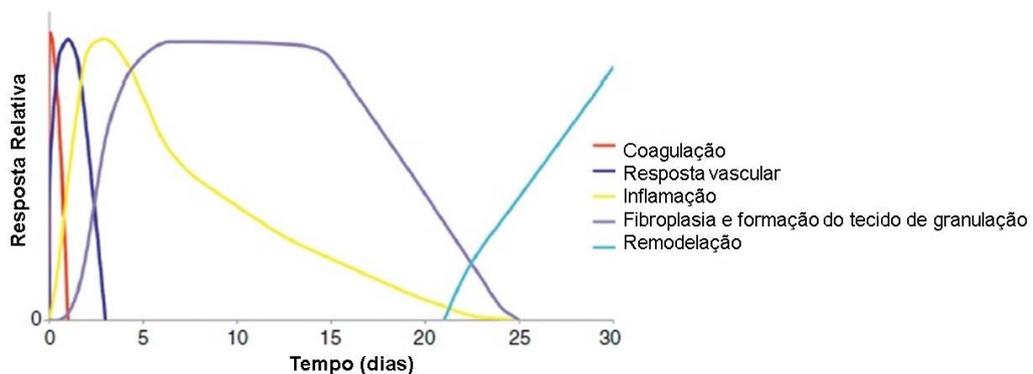
**C) Proliferação celular:** O local mais superficial de proliferação celular na cicatrização é a formação do epitélio na borda da incisão. Este é um passo importante e onde não se deseja a modulação da cicatrização normal, pois resultaria na deiscência de suturas e, por conseguinte, no vazamento da ampola filtrante e predisposição à infecção. Inicia-se horas após a incisão pela reaproximação das bordas da ferida, com a modificação estrutural da célula conjuntival, favorecendo a migração dessas células. Por baixo do epitélio, o tecido de granulação continua a se formar. O tipo principal de célula implicado nesse processo é o fibroblasto, que chega ao local da lesão em torno de 24 horas. Ele sintetiza o colágeno, a elastina, o glicosaminoglicano e a fibronectina para criar a MEC, composta por tecido conjuntivo frouxo. O PDGF estimula os fibroblastos e as células inflamatórias a liberarem TGF- $\beta$ , que, por sua vez, através de sua ação autócrina, estimula outros fibroblastos a aumentarem a produção de colágeno. Alguns fibroblastos também se diferenciam em

---

miofibroblastos, com capacidade contrátil semelhante às células do músculo liso; desempenhando, dessa forma, importante papel na contração da ferida e no seu fechamento, além de contribuir para a produção de MEC. O tecido cicatricial imaturo inicial é ainda remodelado através da liberação de metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) a partir dos fibroblastos e dos macrófagos, ajudando a degradar a MEC, criando um caminho para a migração de fibroblastos através do coágulo de fibrina e do tecido de granulação recém-criado. Logo após a formação da ferida, a angiogênese também se inicia mediada por fatores pró-angiogênicos, como o VEGF e o FGF- $\beta$  secretados pelos macrófagos e pelas plaquetas. As células endoteliais vasculares proliferam para formar brotos capilares imaturos que, eventualmente, unem-se para formar leitos capilares maduros. A combinação do tecido conjuntivo recém-formado com os vasos sanguíneos constitui o tecido de granulação inicial.

**D) Remodelação tecidual:** Na fase final da cicatrização, o tecido fibrovascular imaturo é remodelado para uma cicatriz madura. Os ativadores de plasminogênio e as MMP degradam a MEC através da remoção do ácido hialurônico e da fibronectina. Vários tipos de células inflamatórias (incluindo fibroblastos, neutrófilos e macrófagos) podem sintetizar MMP no local da ferida. As MMP são inibidas por uma família de inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMPs), produzidos pela maioria das células mesenquimatosas, prevenindo, assim, a ação descontrolada dessas proteases. Os proteoglicanos são depositados e o colágeno tipo III é substituído por colágeno tipo I, assim como o número de fibroblastos diminui lentamente. Durante as próximas semanas a meses, o colágeno sofre ligações cruzadas e é desidratado para maior resistência à tração. Assim, ocorre a transição de um tecido de granulação altamente celular para uma cicatriz hipocelular densa. Um acontecimento importante nesta fase é a morte celular dos fibroblastos por apoptose.

O tempo é fundamental, pois a apoptose precoce pode levar ao fechamento insuficiente da ferida e o atraso na apoptose dos fibroblastos pode levar à cicatrização excessiva e à fibrose. A maioria das cicatrizes normais apresenta mínima atividade de fibroblastos, um ano após a criação da ferida. A MMC pode induzir a apoptose do fibroblasto *in vitro*, sugerindo que este possa ser o mecanismo pelo qual este agente citotóxico modula a cicatrização. Embora classificada como uma etapa distinta, a fase de remodelação se sobrepõe a outras fases que se iniciam dentro de dias da lesão e pode durar várias semanas. A modulação desta fase final não é fácil, especialmente com relação à época de aplicação do agente modulador.



**Figura 5:** Representação simplificada da duração das etapas da cicatrização nos tecidos em geral (Adaptado de LOCKWOOD; BROCCINI; KHAW, 2013).

O sucesso da cirurgia fistulizante do glaucoma depende da extensão e da qualidade da modulação da cicatrização que ocorre no pós-operatório, levando em consideração que o humor aquoso tem fatores estimuladores de fibroblastos, como o VEGF, caracteristicamente detectado em concentração

aumentada no humor aquoso dos portadores de glaucoma (KHAW et al., 1994; LI et al., 2009; SEIBOLD; SHERWOOD; KAHOOK, 2012).

Embora a maioria dos cirurgiões almeje o fechamento da ferida e sua cicatrização definitiva, o cirurgião do glaucoma esforça-se para uma interrupção controlada e cautelosa da formação do tecido cicatricial no pós-operatório. Durante décadas, tem-se tentado resolver este paradoxo cirúrgico com agentes que modulam a cicatrização de feridas. Como o processo cicatricial é complexo e prolongado, oferece muitos locais para a potencial modulação (SEIBOLD; SHERWOOD; KAHOOK, 2012), como exemplificado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Sequência de eventos da cicatrização e possíveis métodos de modulação da cicatrização na cirurgia filtrante do glaucoma. (Adaptado de KHAW et al., 1994).

| EVENTOS  | MECANISMOS DE MODULAÇÃO  |
|--|--|
| Incisão da conjuntiva, da episclera e da esclera<br>Dano ao tecido conjuntivo  | Mínimo trauma<br>Técnica cirúrgica menos invasiva  |
| Liberção de proteínas do plasma e do sangue<br>Ativação da coagulação e do complemento<br>Liberção de fatores de crescimento no sangue | Hemostasia<br>Agentes prevenindo ou removendo fibrina<br>Antagonistas da produção/ativação dos fatores de crescimento, anticorpos para fatores de crescimento ou seus receptores |
| Quebra da barreira hematoaquosa<br>Liberção de fatores do crescimento no humor aquoso  | Agentes que estabilizam a barreira hematoaquosa  |
| Migração e proliferação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos  | Antagonistas dos fatores de crescimento  |
| Migração e proliferação de fibroblastos  | Agentes antiinflamatórios<br>Agentes antiproliferativos  |
| Contração da ferida  | Agentes antiproliferativos   |
| Síntese de colágeno, glicosaminoglicano e fibronectina pelo fibroblasto  | Drogas que agem inibindo a contração da ferida   |
| Modificação do colágeno (ligações covalentes)  | Drogas que inibem essa ligação covalente   |
| Migração e proliferação de células endoteliais para formação de novos vasos  | Inibidores da angiogenese  |
| Síntese continuada de colágeno   | Antimetabólitos  |
| Resolução da cicatrização, apoptose e o desaparecimento dos fibroblastos   |  |
| Cicatriz subconjuntival fibrosa  |  |

### 1.2.1 Drogas moduladoras da cicatrização

O uso prolongado de medicação hipotensora ocular tópica provoca estado inflamatório crônico da cápsula de Tenon, com consequente proliferação fibroblástica excessiva (ALMEIDA; COHEN, 2008; BAUDOUIN et al., 1994; BROADWAY et al., 1994; MASTROPASQUA et al., 2013). Dessa forma, iniciaram-se pesquisas para o desenvolvimento de agentes antifibróticos com o intuito de melhorar os resultados em olhos refratários à TREC. Foram realizados ensaios com **penicilamina-D** (MCGUIGAN; COOK; YABLONSKI, 1986),  **$\beta$ -aminopropionitrila** (MCGUIGAN et al., 1987), **corticosteroides** (NGUYEN; LEE, 1992; GIANGIACOMO; DUEKER; ADELSTEIN, 1986), com sucesso limitado (ALMEIDA; COHEN, 2008).

- **5- FLUOROURACIL (5-FU):** É um agente quimioterápico, análogo da pirimidina, que age bloqueando a síntese de DNA inibindo, assim, a proliferação fibroblástica (SHAPIRO et al., 1985; VAN BERGEN et al., 2014). Foi o primeiro antimetabólito utilizado em 1982 por Makoto Araie, através de injeções subconjuntivais aplicadas no pós-operatório da TREC, fornecendo melhores resultados que os agentes até então pesquisados (ALMEIDA; COHEN, 2008). Gressel, Parrish e Folberg (1984) publicaram seus resultados em um modelo animal, demonstrando a efetividade do 5-FU na formação da ampola filtrante. Pouco tempo depois, foi criado o *Fluorouracil Filtering Surgery Study Group* (FFSSG) e, então, iniciado seu primeiro ensaio clínico randomizado (FFSSG, 1989, 1996). Estudo *in vitro* demonstrou que cinco minutos de exposição ao 5-FU pode ter um efeito inibitório de até 30 dias na cultura de fibroblastos da Tenon (KHAW et al., 1992). Os efeitos adversos do 5-FU são reflexos de sua interferência nas células com maior replicação, causando defeitos epiteliais corneanos e vazamento conjuntival, com maior risco de complicações decorrentes de ampolas isquêmicas, como endoftalmite e maculopatia hipotônica (SHAPIRO et al., 1985; VAN BERGEN et al., 2014).
- **MITOMICINA C (MMC):** é um antibiótico obtido a partir do fungo de solo *Streptomyces caespitosus*. Após a redução, a molécula se torna

um antimetabólito alquilante e quimioterápico. É considerada cerca de 100 vezes mais potente que o 5-FU, o seu efeito independe da fase do ciclo celular e exposições breves são suficientes para suprimir a proliferação de quaisquer tipos celulares. É um potente inibidor da proliferação fibroblástica em cirurgias filtrantes, sendo descrito para este fim pela primeira vez em 1983, por Chen-Wu Chen. Desde então, vários autores comprovaram os excelentes resultados do uso peroperatório da MMC, especialmente em pacientes com glaucomas refratários (ALMEIDA; COHEN, 2008; COSTA et al., 1999; SEIBOLD; SHERWOOD; KAHOOK, 2012; VAN BERGEN et al., 2014). É importante ressaltar que diferentes aspectos da administração da MMC, incluindo a dose e o tempo de exposição, podem determinar o bom resultado cirúrgico e afetar o processo de cicatrização da ferida. A breve aplicação peroperatória de MMC 0,2 mg/ml (2-2,5 minutos) é tão eficaz para a melhoria do resultado cirúrgico quanto uma exposição longa (5 minutos) (MÉGEVAND et al., 1995; SCHNYDER et al., 1995; VAN BERGEN et al., 2014), enquanto que uma dose baixa de MMC (0,002%) mostrou eficácia reduzida, em comparação com uma dose mais elevada (0,02%) (THORNTON; XU; KRUEGER, 2008; VAN BERGEN et al., 2014). Infelizmente, a sua utilização está associada a várias complicações, em particular, a produção de ampolas finas císticas avasculares, com os riscos inerentes de persistente hipotonia ou endoftalmite (CORDEIRO et al., 1997), podendo penetrar na esclera e exercer efeito tóxico direto sobre o corpo e epitélio ciliar, possivelmente reduzindo a produção de humor aquoso (NUYTS et al., 1994).

Diante dos severos efeitos colaterais dessas duas drogas atualmente em uso (5-FU e MMC), outras substâncias que sejam mais seletivas e menos tóxicas estão em estudo para substituí-las na função de suprimir a cicatrização de ferida após a cirurgia fistulizante do glaucoma (TURGUT et al., 2014), tais como:

- **METILCELULOSE:** é um composto químico derivado de celulose e, assim como a celulose, não é digerível, tóxica ou um alérgeno. É vendida sob uma variedade de nomes comerciais e utilizada como espessante e agente emulsionante em produtos alimentares e cosméticos. É também largamente utilizada na oftalmologia como, por exemplo, lubrificante para tratamento de olho seco e como mantenedor de câmara anterior durante cirurgias intraoculares. Em 2006, foi publicado artigo que demonstrou diminuição da taxa de cicatrização subconjuntival após TREC experimental em coelhos (SHOUMAN et al., 2006).
- **HIALURONATO DE SÓDIO 2,3%:** é o principal componente de uma variedade de agentes oftálmicos viscoelásticos utilizados nas cirurgias oftalmológicas. A preparação de alto peso molecular, com alta viscosidade, exibe excelente propriedade mecânica para criar e preservar espaços entre os tecidos (ARSHINOFF; ALBIANI; TAYLOR-LAPORTE, 2002). Foi demonstrado, *in vitro*, que o hialuronato de sódio tinha a capacidade de afetar a mobilidade, a proliferação e a atividade metabólica dos fibroblastos (BALAZS et al., 1972). Em estudo publicado em 2006, não houve diferença estatisticamente significativa nas taxas de sucesso da TREC em pacientes que receberam o hialuronato de sódio 2,3% subconjuntival em comparação com o grupo controle (que recebeu solução salina), no entanto, foi associado a ampolas cirúrgicas mais difusas no pós-operatório (LOPES et al., 2006).
- **LERDELIMUMAB (CAT-152):** é um anticorpo monoclonal IgG4 humano que neutraliza o TGF- $\beta_2$  e foi concebido para potencial uso terapêutico como inibidor da cicatrização. Em um modelo experimental de cirurgia fistulizante do glaucoma, injeções subconjuntivais dessa droga melhoraram a sobrevida da ampola cirúrgica. Em ensaios clínicos fase 1 e 2, demonstrou ser seguro, bem tolerado e eficaz na manutenção da TREC, diminuindo a PIO após cirurgia em pacientes

portadores de glaucoma primário. Em ensaio clínico fase III, publicado em 2007, não obteve sucesso como adjuvante da TREC (KHAW et al., 2007).

- **BEVACIZUMAB:** é um anticorpo monoclonal não-seletivo humanizado, que age inibindo o VEGF. O VEGF induz a cicatrização em feridas cutâneas, aumentando a vascularização e a deposição de colágeno, além de promover a rápida migração de células inflamatórias e fibroblastos. O Bevacizumab tem sido largamente utilizado, por exemplo, no tratamento de câncer colorretal metastático e, como injeção intravítrea, no tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI), da retinopatia diabética proliferativa (RDP) e do glaucoma neovascular (MATHEW; BARTON, 2011; PAULA et al., 2013). Em 2009, dois estudos evidenciaram que esta droga reduz a proliferação de fibroblastos *in vitro* e a melhoria do resultado cirúrgico em modelo experimental de cirurgia fistulizante do glaucoma (LI et al., 2009; MEMARZADEH et al., 2009). Nos últimos anos, vem sendo largamente pesquisado como droga adjuvante na cirurgia fistulizante do glaucoma, com resultados promissores (CHENG et al., 2015; AKKAN; CILSIM, 2015; OZGONUL; MUMCUOGLU; GUNAL, 2014; FAKHRAIE et al., 2014).
- **siRNA:** é uma pequena molécula de RNA interferente, que age inibindo a expressão de um gene específico e, portanto, impede a síntese de uma proteína codificada por um RNA mensageiro (RNAm) alvo. Em 2010, foi publicado artigo que demonstrou que o siRNA mediando o silenciamento do gene da enzima Skp2 (proteína quinase 2 interage com a fase S do ciclo celular) inibiu a proliferação celular e diminuiu a viabilidade celular de fibroblastos da cápsula de Tenon, *in vivo* e *in vitro*. Esses achados sugerem que a terapia genética, direcionada para os genes do ciclo celular, pode proporcionar um tratamento alternativo adjuvante anticicatrizante em longo prazo para a cirurgia do glaucoma, sem as complicações associadas com os antimetabólitos (WANG et al., 2010).

- **DIMETHYLENASTRON:** é um membro da classe da quinazolina-2(1H)-tione e é 100 vezes mais potente do que drogas da mesma família. Age inibindo a cinesina Eg5, uma proteína motora envolvida na formação e manutenção do fuso mitótico, que desempenha papel crucial na divisão celular e é, por conseguinte, um importante alvo na terapia do câncer, uma vez que demonstrou alta atividade antiproliferativa. No entanto, estudo realizado em 2010 demonstrou que a aplicação subconjuntival desta droga em TREC experimental não melhorou consistentemente o resultado cirúrgico, talvez por atuar apenas em uma restrita janela terapêutica do complexo processo cicatricial (LÜKE et al., 2010).
- **BETATERAPIA:** é aplicada com placa de Estrôncio 90 de 1 cm<sup>2</sup>, a partir da qual são emitidos feixes de radiação  $\beta$ , com capacidade de penetração nos tecidos. A betaterapia acarreta a hidrólise da água, com liberação de radicais livres que reagem com o DNA e inibem a proliferação de fibroblastos da cápsula de Tenon e conjuntiva, demonstrando, assim, melhora da sobrevida da TREC (KHAW et al., 1991; KIRWAN et al., 2006; REHMAN et al., 2002). Em uma metanálise publicada em 2011, observou-se aumento na taxa de sucesso da TREC usando a betaterapia como adjuvante (FENDI et al., 2011).
- **PIRFENIDONA:** É uma pequena molécula de piridina (SWIGRIS; BROWN, 2006). O seu efeito antifibrótico e sua segurança foram estabelecidos em órgãos como pulmão, fígado e rim em modelos animais e ensaios clínicos. Pode diminuir a ação de uma série de citocinas importantes no processo de cicatrização de feridas, tais como o TGF- $\beta$ , o CTGF, o PDGF e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Em células do epitélio pigmentar da retina (EPR) humano, demonstrou parar a síntese de fibronectina induzida por TGF- $\beta_1$ . Além disso, tem efeito antifibrótico sobre fibroblastos orbitais em pacientes com oftalmopatia associada à tireoide. Zhong et al. (2011) utilizaram colírio com esta substância em modelo de TREC experimental em coelho e

evidenciaram a redução da cicatrização da ferida cirúrgica, sendo considerada uma opção de tratamento antifibrótico que pode ser mais segura do que a MMC.

- **INTERFERON  $\alpha$ -2b:** o interferon  $\alpha$  é uma citocina com efeito antifibrótico evidenciado *in vitro* e *in vivo* (GILLIES; SU, 1991). Em 2011, estudo publicado utilizando injeções subconjuntivais de interferon  $\alpha$ -2b, combinadas com agulhamento de ampolas cirúrgicas encapsuladas, demonstraram eficácia no tratamento da cicatrização precoce, evoluindo com redução da PIO após 12 meses de seguimento em 77,4% dos olhos tratados, além de baixo índice de complicações (WANG et al., 2011).
- **DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE CORTICÓIDE SUBCONJUNTIVAL:** microfilme biodegradável com sistema de liberação prolongada de acetato de prednisolona 20% inserido na região subconjuntival, adjacente ao local da cirurgia filtrante, foi capaz de reduzir a inflamação pós-operatória e prolongar a sobrevivência da ampola filtrante, comparado com o grupo controle, em modelo experimental de cirurgia fistulizante (ANG, 2011). Efeito este também observado com o Ozurdex<sup>®</sup>, implante de liberação prolongada de dexametasona, também testado em modelo animal (SOOHOO et al., 2012).
- **TACROLIMUS:** é uma lactona macrolídea isolada de culturas da bactéria *Streptomyces tsukubaensis*. Tem sido comercializada como potente agente imunossupressor para prevenir ou tratar a rejeição de enxertos em pacientes transplantados e para o tratamento de doenças autoimunes, incluindo a miastenia grave, artrite e dermatite atópica. Pode modular a cicatrização de feridas através da supressão das células inflamatórias e/ou diminuição nos níveis de citocinas que regulam a inflamação. Tem se mostrado eficaz para inibir a proliferação de fibroblastos da cápsula de Tenon de pterígio e do sítio cirúrgico de TREC experimental (ARSLAN et al., 2012).

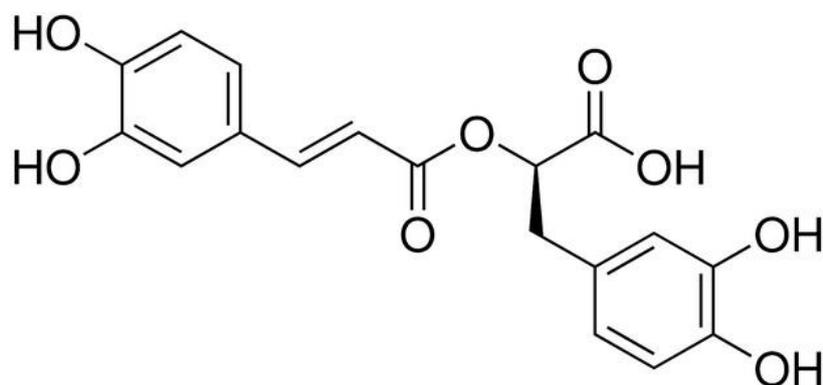
- **OCTREOTIDA:** É um octapeptídeo sintético análogo da somatostatina endógena com mais potência e meia-vida mais longa. Tem propriedades, tanto antissecretora quanto antiproliferativa. Neste caso, age inibindo a proliferação de linfócitos humanos e a quimiotaxia de monócitos. O efeito modulador sobre a cicatrização de feridas pode ser também devido à inibição da produção e secreção do hormônio do crescimento e do IGF-1. Pode atuar como agente anti-inflamatório e antioxidante, por meio da modulação da liberação de citocinas inflamatórias. Arslan et al. (2012) evidenciaram que a administração por via tópica de Tacrolimus e Octreotida reduziu a cicatrização subconjuntival após TREC experimental, inibindo a proliferação de fibroblastos, diminuindo o número de células mononucleares e reduzindo os níveis de TGF- $\beta$  e de FGF- $\beta$  na região do retalho escleral.
- **SARATIN:** é uma proteína originalmente isolada da saliva da sanguessuga *Hirudomedicinalis*. Age interferindo nas ligações integrina $\alpha_2\beta_1$  plaquetária-colágeno e fator de Von Willebrand-colágeno, evitando a agregação das plaquetas em resposta a uma lesão podendo, dessa forma, prevenir a liberação de fatores de crescimento tais como o PDGF, o TGF- $\beta$ , o IGF e o EGF. Evidências recentes sugerem que ela também pode interferir com a ligação das células inflamatórias com as proteínas da MEC, um passo necessário para a migração celular no local da lesão tecidual. Recentes estudos em modelos humanos têm demonstrado que essa proteína tem potentes propriedades antitrombóticas, tornando-a útil no tratamento de lesões ateroscleróticas. Um estudo experimental randomizado demonstrou aumento da sobrevida da ampola cirúrgica, em comparação ao grupo controle, e sem diferença estatística em relação ao grupo da MMC, após injeção subconjuntival desta droga no pós-operatório de cirurgia filtrante do glaucoma, porém sem sinais de toxicidade local observada com a MMC (MIN et al., 2012a,b).

- **SONEPCIZUMAB:** é um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra a esfingosina 1-fosfato (S1P). O S1P é um lisofosfolípídeo bioativo que participa de diversas funções fisiológicas, em particular proliferação, sobrevivência e migração celular. O sonepcizumab apresenta potencial atividade antiangiogênica e antineoplásica que, por sua vez, age limitando a quantidade de moléculas de S1P livres nos tecidos reduzindo, assim, a atividade fibrótica. Atualmente, o anticorpo está na fase I de ensaios clínicos para o tratamento de câncer e DMRI. Lukowski et al. (2013), evidenciaram a sua ação adjuvante na cirurgia fistulizante experimental, com aumento da sobrevida da ampola cirúrgica e menos fibrose, se comparado com o grupo controle.
- **INFLIXIMAB:** é um anticorpo IgG1 monoclonal quimérico rato/humano, que inibe o TNF- $\alpha$ . Este, por sua vez, estimula os fagócitos mononucleares, bem como outros tipos de células que produzem várias citocinas pró-inflamatórias e induz a migração de leucócitos polimorfonucleares. O infliximab se liga à molécula de TNF- $\alpha$  e reduz a migração de linfócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1, IL-6 e moléculas de adesão. É um agente usado no tratamento de doenças autoimunes tais como: doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, uveíte, esclerite e doença de Behçet. Foi também relatado recentemente que o infliximab é eficaz no tratamento da neovascularização da coroide e na prevenção da neovascularização da córnea. Em estudos recentes, foi demonstrado que o infliximab diminuiu a expressão e os níveis de citocinas, que desempenham papel importante na resposta cicatricial de feridas, incluindo o TGF- $\beta$ , o FGF- $\beta$  e o PDGF-B. Turgut et al. (2014) publicaram seus resultados utilizando esta droga em modelo experimental de cirurgia fistulizante, com resultados promissores, demonstrando eficácia antifibrótica comparável à MMC.

- **TRASTUZUMAB:** é um anticorpo monoclonal IgG humanizado. Liga-se com alta afinidade pelo receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). É utilizado no tratamento contra o câncer de mama, em que ocorre a sobre-expressão do HER2. Em modelo animal para estudo de tumor, ele reduziu a expressão de fatores pró-angiogênicos, enquanto que a expressão de fatores antiangiogênicos aumentou. Em 2014, pesquisadores demonstraram, em TREC experimental, que esta droga diminuía a infiltração de fibroblastos no local da cirurgia, possivelmente pela inibição da proliferação e da migração de fibroblastos, por efeito tóxico ou pela redução de TGF- $\beta$ , FGF- $\beta$  e PDGF (TURGUT et al., 2015).

### 1.3 Ácido rosmarínico

Em 1958, dois químicos italianos, Scarpati e Oriente, isolaram pela primeira vez um composto puro chamado de ácido rosmarínico, da planta *Rosmarinus officinalis* (conhecida em português como alecrim). A estrutura foi elucidada como um éster dos ácidos caféico e 3,4-di-hidroxifenilático (PETERSEN; SIMMONDS, 2003) (Figura 6). A sua síntese química foi finalmente alcançada em 1991 por Albrecht (ZINSMEISTER; BECKER; EICHER, 1991). Desde então, várias sínteses químicas do ácido rosmarínico e de seus derivados foram descritas, sendo comercializado em preparações de cosméticos e complementos alimentares (KRAJČOVIČOVÁ; MELUŠ, 2013).



**Figura 6:** Molécula do Ácido Rosmarínico ( $C_{18}H_{16}O_8$ ) (Adaptado de SIGMA ALDRICH, [sd.]).

Esse composto é comumente encontrado na família de plantas *Boraginaceae* e na subfamília *Nepetoideae* da família *Lamiaceae* como, por exemplo, as ervas aromáticas (alecrim, erva-cidreira, sálvia, manjeriço, orégano, entre outras), além de ter sido descrito menos frequentemente em outras famílias de plantas (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). Nas plantas, ele age, possivelmente, como um composto pré-formado de defesa constitutivamente acumulado (KRAJČOVIČOVÁ; MELUŠ, 2013). Uma infinidade de atividades biológicas têm sido descritas para o ácido rosmarínico, sendo as principais: antioxidante, antitumoral, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antifibrótica (PETERSEN; SIMMONDS, 2003).

As propriedades anti-inflamatórias baseiam-se na inibição das enzimas lipoxigenases e cicloxigenases e na interferência na cascata do complemento (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). O ácido rosmarínico mostrou efeitos inibitórios significativos sobre a inflamação induzida por lipopolissacarídeos nas células dendríticas derivadas da medula óssea; em primeiro lugar, por inibir o recrutamento de macrófagos pela quimiocina, via sinalização celular pela proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) (KIM et al., 2008). Também demonstrou efeito inibitório sobre a produção, induzida por lipopolissacarídeo, de óxido nítrico e da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em

---

macrófagos (QIAO et al., 2005). A sua ação antiviral foi detectada em camundongo, em modelo de encefalite, em que o ácido rosmarínico reduziu a replicação viral no cérebro e a inflamação secundária resultante da ativação da micróglia. Essa ação anti-inflamatória foi confirmada *in vitro*, uma vez que a infecção viral das células aumentou a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias e o tratamento das células infectadas com esta droga reduziu significativamente os níveis de IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e proteína quimioatrativa de monócito-1 (MCP-1), em comparação com os níveis nos animais infectados não tratados (SWARUP et al., 2007).

Huang e Zheng (2006) demonstraram, *in vitro*, a sua ação antiangiogênica, inibindo a proliferação celular endotelial, migração, adesão e formação de tubos vasculares pelas células endoteliais. O mecanismo pode estar relacionado com a sua atividade antioxidante, que resultou na inibição das espécies reativas de oxigênio associadas à expressão de VEGF e liberação de IL-8. Este efeito também foi notado em modelo experimental de retinopatia da prematuridade, em que o ácido rosmarínico inibiu a neovascularização retiniana sem, no entanto, causar toxicidade tecidual (KIM et al., 2009). Além disso, o ácido caféico, um dos principais componentes do ácido rosmarínico, e seus derivados inibiram de forma eficaz a angiogênese patológica em tumor, principalmente através da inibição da atividade da STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) (JUNG et al., 2007).

Em modelo animal de fibrose hepática, o ácido rosmarínico diminuiu a intensidade da fibrose, inibindo o TGF- $\beta_1$ , o CTGF e a ativação das células estelares hepáticas (LI et al., 2010). Agiu inibindo a proliferação e induzindo a apoptose das células estelares hepáticas, em parte devido à inibição da fosforilação do STAT3, contribuindo, dessa forma, para a reversão da fibrose hepática (ZHANG et al., 2011). Em outro estudo, com cultura de células mesangiais (aumentadas na glomerulonefrite, por exemplo), o ácido rosmarínico exibiu efeitos antiproliferativos sobre essas células e efeitos supressivos sobre o PDGF (MAKINO et al., 2000).

Através do extrato de *Perilla frutescens* (uma das guarnições mais populares no Japão), o ácido rosmarínico desempenhou papel anticancerígeno

---

por dois efeitos independentes: atividades anti-inflamatórias, tais como a inibição da molécula de adesão, da quimiocina e da síntese dos eicosanoides, e atividade antioxidante, como a inibição da lesão oxidativa do DNA (OSAKABE et al., 2004).

É bem absorvido a partir do trato gastrointestinal e da pele. Experimentos com ratos puderam demonstrar que, aplicado topicamente na pele, após absorção por via percutânea, encontrou-se distribuído na pele, no sangue, nos ossos e músculos, enquanto que administrado intravenosamente encontrava-se distribuído em vários órgãos, tais como: pulmão, baço, coração e fígado (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; BABA et al., 2004). É rapidamente eliminado da circulação sanguínea após a administração oral e intravenosa, além de demonstrar muito baixa toxicidade, testada em camundongos (FURTADO et al., 2008; LI et al., 2010; PETERSEN; SIMMONDS, 2003; ROSSI et al., 2012).

#### **1.4 Justificativa**

Atualmente, o 5-FU e a MMC são as drogas utilizadas no controle da cicatrização da cirurgia fistulizante do glaucoma. Como potenciais efeitos colaterais, apresentam o risco de má cicatrização, com o desenvolvimento de uma conjuntiva fina, hiperfiltração, possibilidade de vazamento prolongado de humor aquoso no pós-operatório e outras complicações potencialmente causadoras de cegueira. Tendo em vista as múltiplas reações adversas observadas com o uso dos atuais moduladores da cicatrização nas cirurgias fistulizantes do glaucoma, torna-se interessante a busca por novos compostos adjuvantes, motivo da realização deste estudo com o ácido rosmarínico.

## ***2. Objetivos***

---

Os objetivos do presente estudo são:

1. Comparar os achados clínicos em termos de PIO, aspectos da ampola filtrante, inflamação conjuntival e complicações cirúrgicas entre olhos de coelhos submetidos à cirurgia antiglaucomatosa experimental e tratados, ou não, com injeções subconjuntivais de ácido rosmarínico.
2. Avaliar a resposta inflamatória, fibrogênica e angiogênica, por histologia e imuno-histoquímica em amostras de conjuntiva, de cápsula de Tenon e de esclera retiradas do sítio cirúrgico desses olhos.
3. Verificar diferenças na expressão gênica de fatores relacionados à fibrogênese tecidual, especificamente colágeno tipo 1 alfa-1 e TGF- $\beta_2$ , em amostras dos sítios cirúrgicos.

### ***3. Material e Métodos***

---

### 3.1 Desenho do estudo

Estudo experimental intervencionista, do tipo ensaio clínico randomizado, realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

### 3.2 Animais

Foram estudados 62 coelhos *New Zealand (Oryctolagus cuniculus)*, fêmeas, albinos, pesando entre 2.0 e 2.5 kg, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Todos os coelhos foram aclimatizados durante, pelo menos, cinco dias antes do início do experimento. Por motivos éticos e de padronização do estudo, utilizou-se somente o olho direito (OD) de todos os coelhos para os procedimentos experimentais.

Os animais foram mantidos em gaiolas (no máximo, dois coelhos por gaiola) no Biotério da Cirurgia Experimental da FMRP-USP, em ambiente climatizado (ar condicionado a 22°C - 26°C), em ciclo claro-escuro de 12h, com livre acesso à água e à ração apropriada.

A pesquisa seguiu as diretrizes para cuidados com experimentação animal da *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* e foi previamente aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, Processo nº 124/2009 (Anexo A).

### 3.3 Forma de apresentação, via de utilização e dose do ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi adquirido na forma de pó e diluído em solução salina a 0,9%, a fim de se obterem as concentrações finais: 0,3 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 15 mg/ml e 50 mg/ml. O volume utilizado na injeção subconjuntival foi de 0,1 ml da suspensão, nos tempos descritos a seguir.

### 3.4 Estudo piloto

Foram realizados dois ensaios para determinação de curvas dose-resposta para investigação da dose ideal do composto, a ser aplicada neste estudo.

As injeções subconjuntivais de ácido rosmarínico, realizadas durante estes ensaios, seguiram o mesmo protocolo desta pesquisa, porém os animais foram submetidos à eutanásia no 10º dia de pós-operatório (DPO), para posterior enucleação do olho operado e avaliação histopatológica qualitativa do sítio cirúrgico, realizadas por patologista experiente.

O 1ª ensaio dose-resposta foi realizado com 12 coelhos divididos em quatro grupos, com três animais cada, de acordo com três concentrações de ácido rosmarínico (0,3 mg/ml, 1 mg/ml e 3 mg/ml), além do grupo controle. A diluição do ácido rosmarínico em pó com solução salina a 0,9% se mostrou uma suspensão homogênea, porém a preparação de 3 mg/ml demonstrou discreta heterogeneidade na mistura (Figura 7). A avaliação histopatológica não revelou diferenças nos aspectos inflamatório, fibrogênico e na contagem dos vasos sanguíneos/campo entre essas concentrações (0,3 mg/ml, 1 mg/ml e 3 mg/ml) e o grupo controle.



**Figura 7:** Fotos dos *Eppendorfs* contendo as três concentrações propostas para o 1ª ensaio dose-resposta.

O 2ª ensaio dose-resposta foi realizado, com o mesmo protocolo, em três grupos com três animais cada, de acordo com três concentrações de ácido rosmarínico (5 mg/ml, 15 mg/ml e 50 mg/ml). Foram obtidas suspensões menos homogêneas, a saber: 5 mg/ml com pouco precipitado, 15 mg/ml com moderado precipitado e 50 mg/ml com precipitação aumentada e dificuldade de diluição (Figura 8). Após a avaliação histopatológica, as amostras de olhos tratados com a concentração de 15 mg/ml apresentaram menos inflamação ou achados relacionados à fibrogênese e à vascularização, em relação às demais concentrações e ao grupo controle.



**Figura 8:** Fotos dos *Eppendorfs* contendo as três concentrações propostas para o 2ª ensaio dose-resposta.

### 3.5 Grupos de estudo

A amostra foi composta por 41 coelhos *New Zealand* (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, albinos, pesando entre 2.0 e 2.5 kg. Foram considerados dois grupos, a saber: no grupo controle, foi realizada a cirurgia antiglaucomatosa em OD, associada às injeções subconjuntivais de solução salina a 0,9% (**grupo A**) e, no outro grupo, foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico, também em OD, associado às injeções subconjuntivais de ácido rosmarínico 15 mg/ml (**grupo B**). Cada grupo foi dividido, aleatoriamente, em dois subgrupos, de acordo com o dia da eutanásia do animal, como especificado abaixo:

- Grupo A:**    **A1** (n=11) - sacrificados no 5º DPO e  
                  **A2** (n=10) - sacrificados no 15º DPO.
- Grupo B:**    **B1** (n=10) - sacrificados no 5º DPO e  
                  **B2** (n=10) - sacrificados no 15º DPO.

Cada subgrupo (A1, A2, B1 e B2) também foi dividido, aleatoriamente, com metade dos animais destinados para avaliação histopatológica e a outra metade para estudo de reação em cadeia da polimerase do tipo RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) (Figura 9).



**Figura 9:** Organograma da divisão dos grupos.

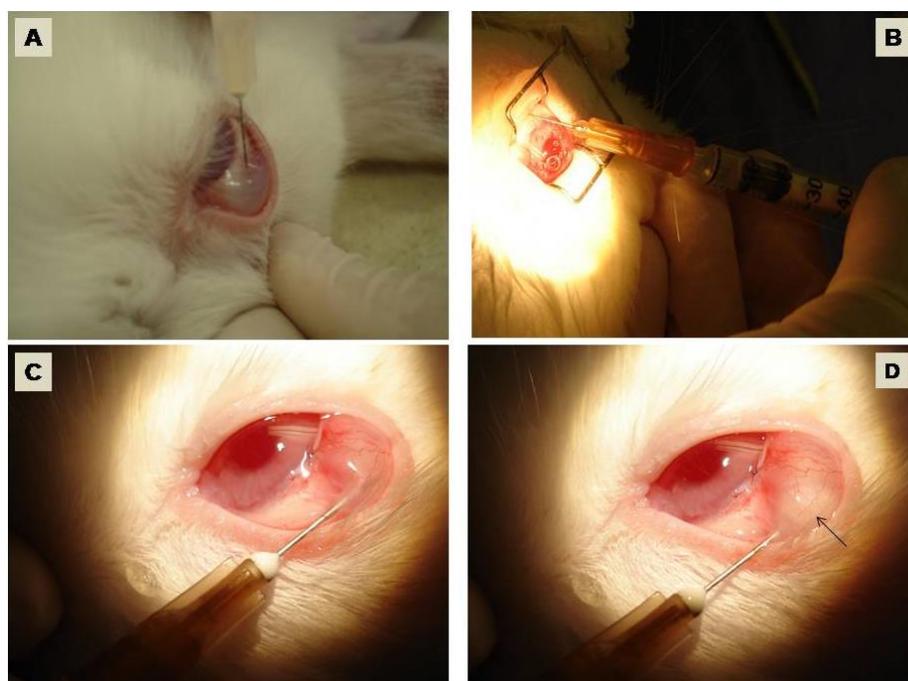
### 3.6 Procedimentos experimentais

O mesmo cirurgião (pesquisadora) realizou todos os procedimentos. A sedação foi realizada em dois momentos: antes de cada injeção subconjuntival, por meio de uma injeção intramuscular de 0,50 ml/kg de solução de quetamina (25 mg/ml) com 0,25 ml/kg de xilazina (10 mg/ml) e, antes da cirurgia, com uma injeção intramuscular de 1 ml/kg de solução de quetamina (50 mg/ml) e 0,5 ml/kg de xilazina (20 mg/ml). Todos os animais receberam anestesia tópica

com colírio de proximetacaína a 0,5% (Laboratórios Alcon, Brasil) antes da injeção subconjuntival, antes da tonometria e antes da cirurgia.

As injeções subconjuntivais, de 0,1ml de ácido rosmarínico 15 mg/ml (**grupo B**) ou 0,1 ml de solução salina a 0,9% (**grupo A**), foram aplicadas, em OD, com o auxílio de uma agulha/seringa de insulina (Figura 10), nos seguintes momentos:

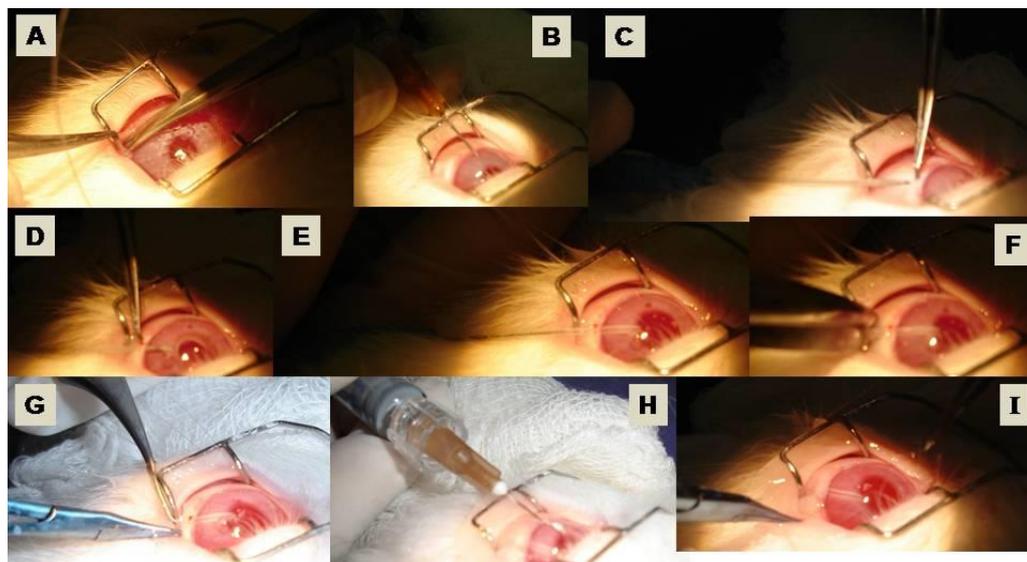
- Três dias antes da cirurgia, na região onde seria realizada a cirurgia antiglaucomatosa (região temporal superior).
- Ao final da cirurgia, em região próxima à ampola filtrante, com o cuidado de não penetrá-la.
- A cada três dias, até a eutanásia do animal.



**Figura 10:** Fotos (A) e (B) representativas do grupo A. Injeção subconjuntival aplicada três dias antes da cirurgia (A) e ao final da cirurgia (B). Fotos (C) e (D) representativas do grupo B. Observar o aspecto externo da região de aplicação antes (C) e depois (D) da injeção subconjuntival de ácido rosmarínico, adquirindo esta coloração amarelada da suspensão (**seta**).

A cirurgia antiglaucomatosa experimental realizada foi planejada com base em detalhes técnicos de estudos previamente publicados (CORDEIRO et al., 1997; SHERWOOD et al., 2004). O procedimento cirúrgico foi realizado seguindo, resumidamente, os seguintes passos:

- Uma peritomia conjuntival de base fórnix foi realizada no OD, na região temporal superior, dissecando a conjuntiva e expondo a esclera (Figura 11A).
- Parte do humor aquoso foi retirado com uma agulha/seringa de insulina (local da paracentese) e substituído por metilcelulose, para maior estabilidade da câmara anterior (Figura 11B).
- Na região exposta, penetrou-se a câmara anterior com uma agulha de 22-gauge (Cateter Insyte 22G, BD Insyte<sup>®</sup>, Becton Dickson Indústria Cirúrgica, MG, Brasil) que, antes de adentrar a câmara anterior, dissecou uma pequena região da esclera anterior ao limbo (Figura 11C), de forma que a agulha ficou paralela ao eixo da íris, com o cuidado de não tocá-la ou traumatizar o endotélio da córnea (Figura 11D). A agulha foi retirada, permanecendo o tubo de *sylastic* inserido na câmara anterior, com sua extremidade distal próxima à pupila, evitando, assim, contatos com a córnea (Figura 11E).
- O tubo foi cortado a um mm de sua inserção na esclera (Figura 11F), de forma biselada e fixada na superfície escleral com *nylon* 10.0 (*Ethicon*<sup>®</sup>; Johnson & Johnson, NJ, EUA) (Figura 11G).
- A câmara anterior foi refeita com metilcelulose, via paracentese (Figura 11H).
- A conjuntiva foi suturada com *nylon* 10.0 (dois pontos, um em cada extremidade da ampola cirúrgica) (Figura 11I).
- Foi realizado teste de Seidel, até que se mostrasse negativo, com confirmação de ampola filtrante formada, difusa e elevada.
- Foi realizada injeção subconjuntival de 0,1 ml da substância, de acordo com o grupo (Figura 10B).



**Figura 11:** Fotos representativas do procedimento cirúrgico (Vide texto para detalhes do procedimento).

No pós-operatório, todos os olhos operados foram tratados com uma combinação tópica de antibiótico (cloridrato de ciprofloxacino - 3,5 mg/g) e corticoide (dexametasona - 1,0 mg/g) (Suspensão Oftálmica 5 ml, Laboratórios Alcon - Brasil), 4x/dia por cinco dias.

A eutanásia dos animais foi realizada com uma infusão endovenosa de 2 ml de tiopentato de sódio 40 mg/ml. Constatada a morte do animal, procedeu-se imediatamente a enucleação do OD, com o cuidado de preservar o sítio cirúrgico, dissecando a conjuntiva tarsal e garantindo, dessa forma, acesso ao espaço periorbitário. A dissecação se estendeu aos músculos oculares e ao espaço retro-orbitário, expondo a esclera até a identificação do nervo óptico, seu isolamento e sua secção.

### 3.7 Parâmetros clínicos

A PIO foi aferida em ambos os olhos com o tonômetro Tonopen (Tonopen Avia<sup>®</sup>, Reichert Inc., NY, EUA), após anestesia tópica (proximetacaína 0,5% - colírio). Tomou-se o cuidado de aferi-la antes da sedação, nos seguintes momentos: antes da cirurgia e antes das injeções subconjuntivais, a cada três dias no pós-operatório, até a eutanásia do animal. A PIO registrada para cada olho foi calculada pela média de três medidas seguidas. Também foi realizada a análise dos níveis da PIO, calculadas as diferenças entre os valores medidos no dia da eutanásia do animal e aqueles prévios à cirurgia, corrigidos pelo valor da PIO do olho contralateral (olho esquerdo - OE), a saber: diferença da PIO ( $\Delta$ PIO) = PIO último DPO (OD-OE) - PIO pré-operatória (OD-OE).

Os olhos operados foram avaliados clinicamente, sob anestesia tópica (proximetacaína 0,5% - colírio) e após a sedação do animal [uma injeção intramuscular de 0,50 ml/kg de solução de quetamina (25 mg/ml) com 0,25 ml/kg de xilazina (10 mg/ml)], por meio de fotografias, dando ênfase aos seguintes fatores: aspectos da ampola filtrante, grau de hiperemia, quemose conjuntival e complicações diversas (tais como: deiscência de sutura, infecções, hemorragias subconjuntivais, hifema, atalamia, entre outras). Tais avaliações foram realizadas a cada três dias no pós-operatório, antes da injeção subconjuntival e antes da eutanásia.

Os aspectos da ampola filtrante também foram classificados de acordo com *Moorfields Bleb Grading System* (WELLS et al., 2006) (Anexo B). Esse sistema leva em consideração a avaliação dos seguintes parâmetros relacionados à ampola filtrante: área central, área máxima, altura e vascularização. Cada um desses parâmetros apresenta um modelo de fotografia padrão segundo o qual se deve atribuir um escore, por comparação visual direta (Anexo B). Tal sistema foi desenvolvido para uso em humanos e, para ser aplicado no presente estudo, pequenos ajustes foram realizados, a saber: foi desconsiderada a elevação conjuntival gerada pela presença do tubo de *sy/astic* e foi dada adequada relação de proporcionalidade das medidas por diferenças anatômicas entre os olhos de coelhos e humanos.

### 3.8 Avaliação histológica

Após a eutanásia dos animais e enucleação do OD, os olhos foram colocados imediatamente em frascos, devidamente identificados e contendo solução fixadora tamponada (formaldeído 10% em tampão fosfato 0,1M). Após 24h de fixação nessa solução, com os tecidos mais enrijecidos, os globos oculares foram cortados, em dois cortes sagitais, preservando o sítio cirúrgico. Essas amostras passaram, então, por desidratação progressiva, em banhos com concentrações crescentes de alcoóis. Foi feita diafanização e preparação de blocos de parafina, seguindo a técnica clássica. A partir dos blocos, foram feitos cortes seriados utilizando-se micrótomo manual. A espessura dos cortes foi de 6  $\mu\text{m}$  e os mesmos foram montados sobre lâminas de histologia. O material foi corado com Hematoxilina & Eosina (HE) e *Sirius Red* em ácido pícrico a 0,1% (*Picro-sirius*) pelo método convencional para todos os cortes. Foram quantificadas, nos cortes histológicos, a quantidade de neutrófilos e de vasos sanguíneos e a densidade de colágeno formado no sítio cirúrgico.

### 3.9 Avaliação imuno-histoquímica

Foram realizadas preparações imuno-histoquímicas para  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), com o intuito de se avaliarem as populações de miofibroblastos, de acordo com o protocolo a seguir:

- Preparação de cortes de 4  $\mu\text{m}$  em lâminas recobertas com poli-L-lisina 0,1%;
- Desparafinização em xilol, gradientes de álcool e água destilada;
- Recuperação antigênica em panela à vapor, com tampão citrato de sódio 0,01 M, pH6;
- Bloqueio da peroxidase endógena com solução contendo água oxigenada 30 volumes a 3% em PBS (phosphate buffered saline), por 15 minutos;

- Bloqueio de ligação com proteínas inespecíficas com 150 µl de soro de cavalo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), por 30 minutos;
- Incubação com anticorpo primário monoclonal anti- $\alpha$ -actina de músculo liso 1:100 (SM- $\alpha$  actin, DAKO A/S, Dinamarca), em câmara úmida por duas horas a 37°C, com posterior lavagem;
- Incubação com anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), diluído 1:50 em PBS, por 35 minutos;
- Incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), diluído 1:100 em PBS por 35 minutos;
- Revelação com substrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (kit de substrato DAB; Vector Laboratories, CA, EUA) por 10 minutos em câmara escura;
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 30 segundos;
- Montagem com Entellan<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc., Franklin, MA, EUA).

Também foram realizadas preparações imuno-histoquímicas com anti-VEGF, de acordo com o protocolo a seguir:

- Preparação de cortes de 6 µm em lâminas recobertas com poli-L-lisina 0,1%;
- Desparafinização em xilol, gradientes de álcool e água destilada;
- Recuperação antigênica em panela a vapor, com tampão citrato de sódio 0,01 M, pH6;
- Bloqueio da peroxidase endógena com solução contendo água oxigenada 30 volumes, a 3% em PBS, por 30 minutos;
- Para o bloqueio das reações inespecíficas, as lâminas foram incubadas em solução de albumina de soro bovino (solução de albumina sérica bovina - BSA 2% diluído em tampão fosfato 0,1 M)

(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) durante 30 minutos, à temperatura ambiente;

- Incubação com anticorpo primário monoclonal humano anti-VEGF 1:50 (VEGF C-1; SC 7269, BD Biosciences Pharmingen, CA, EUA), diluído em 1% solução de BSA. As lâminas foram lavadas seis vezes em tampão PBS 0.1 M, por cinco minutos cada, mantidas em câmara úmida por duas horas a 37°C, com posterior lavagem;
- Incubação com anticorpo IgG secundário biotilado (2 µg/ml) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), por 35 minutos;
- Incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), diluído 1:100 em PBS por 35 minutos;
- Revelação com substrato de 3,3'-DAB (kit de substrato DAB; Vector Laboratories, CA, EUA) por 10 minutos em câmara escura;
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 30 segundos;
- As lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em Tissue Mount (Tissue Tek<sup>®</sup> Glas<sup>™</sup> Mounting Media, Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, EUA).

Controles positivos e negativos também foram realizados e utilizados para avaliar os resultados.

### **3.10 Expressão gênica por RT-PCR em tempo real**

Adotou-se, como controle, amostras (conjuntiva e cápsula de Tenon da região temporal superior) de animais não submetidos a nenhum procedimento ocular (n=5) e, como controle endógeno, o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), para avaliação da expressão de RNAm dos genes alvos, em unidades arbitrárias (UA), com base em cálculos do delta CT.

Imediatamente após a eutanásia dos animais, os olhos operados (OD) foram rapidamente dissecados, a fim de que se retirasse material presente apenas no sítio cirúrgico, somente conjuntiva e cápsula de Tenon, sem aproveitamento da esclera subjacente. Precauções foram tomadas para evitar sangramentos e contaminação da amostra. Logo em seguida, as amostras foram colocadas em microtubos com tampa tipo *Eppendorf* de 1,5 ml, devidamente identificados. Foram estocados imediatamente em *Freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Estas amostras estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram destinadas para quantificação da expressão gênica do colágeno tipo 1 alfa-1 (COL1A1) e do TGF- $\beta_2$ . As amostras teciduais, homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador Polytron (PT 2100, Kinematica Polytron, Newark, NJ, EUA), foram submetidas à extração do RNA total utilizando centrífuga refrigerada (Eppendorf 5415R, Eppendorf do Brasil, São Paulo) e *kit* específico (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). O DNA complementar foi obtido por transcrição reversa a partir de 5  $\mu\text{g}$  de RNA total, utilizando *kits* de retrotranscrição (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads e pd(N)6 Random Hexamer, Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, EUA). A amplificação gênica com simultânea quantificação foi realizada por meio do emprego do sistema “real-time” PCR iQ5 BIO-RAD (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando-se *primers* específicos para os genes do COL1A1, TGF- $\beta_2$  e GAPDH (*mimic*) (Assays-on-Demand Gene Expression Products, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e a enzima Taq Polimerase (TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - 2X, Applied Biosystems).

### 3.11 Estudo morfométrico

A avaliação histológica foi realizada por um patologista com experiência em patologia ocular (Prof. Dr. Fernando Chahud, do Departamento de Patologia da FMRP-USP). A avaliação morfológica foi realizada sem o conhecimento prévio, pelo patologista, a qual animal ou grupo pertencia cada preparação histológica. As preparações histológicas coradas por HE e as de

imuno-histoquímica foram documentadas e analisadas tomando-se três campos de grande aumento (400X) (da região do sítio cirúrgico) de cada um dos cinco cortes de cada animal. As fotomicrografias foram obtidas por um sistema de captura de imagem composto por uma câmera colorida CCD Samsung<sup>®</sup> (SDC-313/243) acoplada ao microscópio Olympus BX41<sup>®</sup> e o *software* analySIS getIT da *Olympus soft imaging solutions GmbH*, do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Uma vez que a análise pode sofrer interferência da intensidade de iluminação e tons das fotografias, toda a documentação foi realizada utilizando-se os mesmos parâmetros do *software* de captura. As fotomicrografias receberam uma codificação para que a identificação do grupo de estudo não fosse possível e foram avaliadas pelo patologista, a quem foi solicitada a contagem dos vasos sanguíneos e dos neutrófilos por campo microscópico.

As densidades de colágeno, da marcação anti- $\alpha$ -actina e anti-VEGF foram calculadas, quantitativamente, pela análise das fotomicrografias pelo *software* ImageJ<sup>®</sup> 1.36 (disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), seguindo a sequência de passos, a saber: em *file*, abriu-se a imagem a ser analisada; em *plugins*, selecionou-se *color function*; neste selecionou-se *color deconvolution*; neste selecionou-se **H AEC** (se foi coloração por *Sirius Red*) ou **H DAB** (se foi imuno-histoquímica); neste momento, a foto foi decomposta em três cores - branca, azul e marrom, desprezando-se as imagem branca e azul, ficando somente com a original, para comparar com a decomposta em marrom; clicou-se em *image*, selecionou-se *type*; neste selecionou-se **8-bit** (a foto marrom ficou em preto e branco); clicou-se em *image*, selecionou-se *adjust*; neste selecionaram-se *threshold*, *Black & White* e clicou-se em *apply* e, logo em seguida em *ok* (o que ficou em preto na foto é o que corou pelo *Sirius Red* ou pela imuno-histoquímica, ou seja, o foco da análise); clicou-se *control M* (ou *analyze* e selecionou-se *measure*) (apareceu a porcentagem de preto na foto - **% área** - este valor foi anotado na planilha para posterior análise estatística). Foi calculada a média para cada animal, a partir dos três valores obtidos para cada corte histológico (três campos analisados por corte).

### 3.12 Análise estatística

Os dados coletados foram descritos aplicando-se parâmetros usuais de estatística descritiva, por meio de média, mediana e erro padrão. Devido à natureza dos dados, os grupos foram comparados utilizando o teste não-paramétrico para variáveis contínuas U-Mann Whitney (*software Prism 5.0 e GraphPad InStat - GraphPad Software Inc., CA, EUA*). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

## ***4. Resultados***

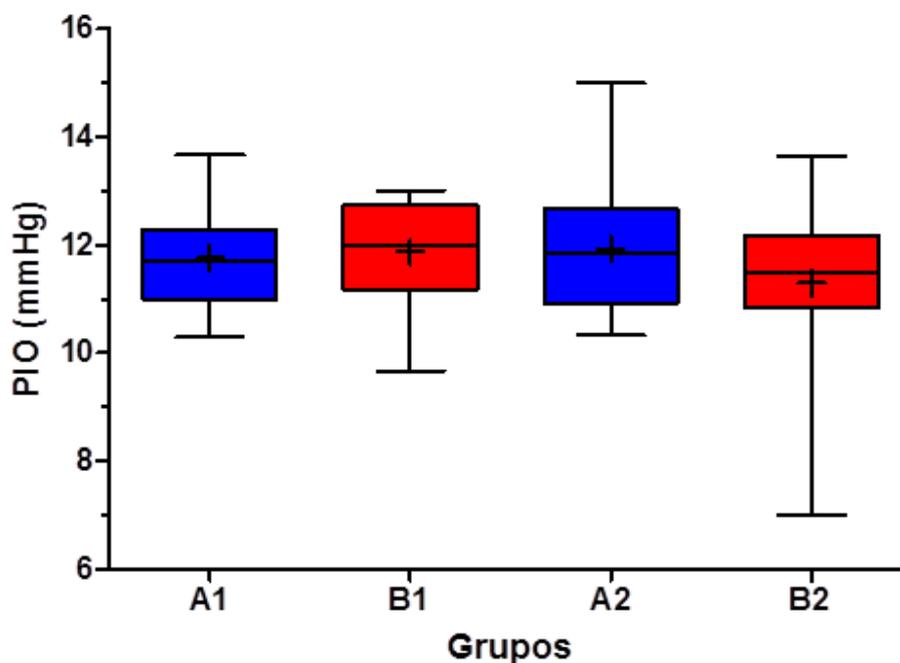
---

Os experimentos seguiram o protocolo programado, sem perdas de animais [n (final) = 41]. No entanto, para a avaliação histológica e imuno-histoquímica para o  $\alpha$ -actina (amostra de 21 animais), durante o processamento do material, o globo ocular de um animal do grupo A1 ficou fragmentado, sem condições de localização do sítio cirúrgico e, portanto, foi desconsiderado [n (final) = 20]. Para a análise imuno-histoquímica para o VEGF (amostra de 21 animais), foram desconsiderados dois globos oculares (um do grupo A2 e outro do grupo B1) por problemas de processamento da amostra [n (final) = 19].

#### 4.1 Parâmetros clínicos

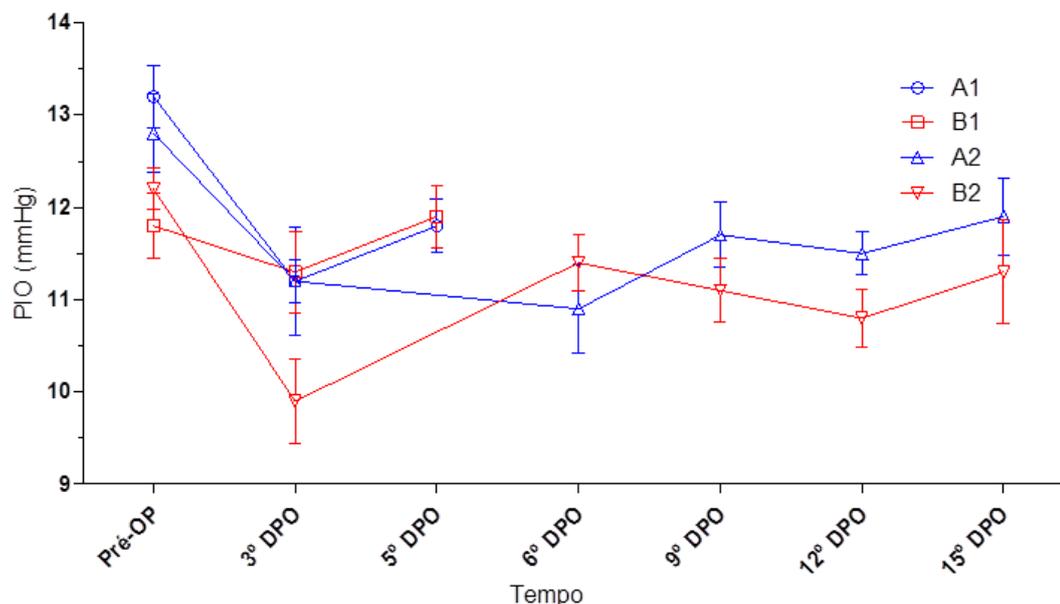
Em todos os animais, não houve quemose em qualquer momento do pós-operatório. A hiperemia conjuntival foi mais acentuada no 3º DPO (variava de 1+ a 3+/4+, sendo mais intensa no grupo A1). No entanto, do 5º DPO em diante, estava ausente na maioria dos animais (variava de ausente a 2+/4+).

Levando em consideração somente o olho operado (OD), não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de PIO entre os grupos no 5º DPO (média  $\pm$  erro padrão: 11,8  $\pm$  0,3 mmHg vs 11,9  $\pm$  0,3 mmHg para o grupo A1 e para o grupo B1, respectivamente) e no 15º DPO (média  $\pm$  erro padrão: 11,9  $\pm$  0,4 mmHg vs 11,3  $\pm$  0,6 mmHg para o grupo A2 e para o grupo B2, respectivamente) (Gráficos 1 e 2).



**Gráfico 1:** Gráfico da comparação entre os grupos dos valores de PIO do OD obtidos no último dia de pós-operatório (n=41). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

De acordo com a fórmula  $[(\Delta\text{PIO}) = \text{PIO último DPO (OD-OE)} - \text{PIO pré-operatória (OD-OE)}]$  para o cálculo da variação da PIO, levando-se em conta o OE, também não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (média  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $-1,7 \pm 0,6$  mmHg vs  $-0,2 \pm 0,4$  mmHg e A2 vs B2:  $-0,8 \pm 0,3$  mmHg vs  $-1,4 \pm 0,3$  mmHg) (Tabela 2).



**Gráfico 2:** Valores de PIO do OD obtidos em cada grupo (média dos grupos para cada momento de aferição) que recebeu (B1, cinco dias e B2, 15 dias) ou não (A1, cinco dias e A2, 15 dias) o tratamento com ácido rosmarínico. Dados apresentados como média e erro padrão.

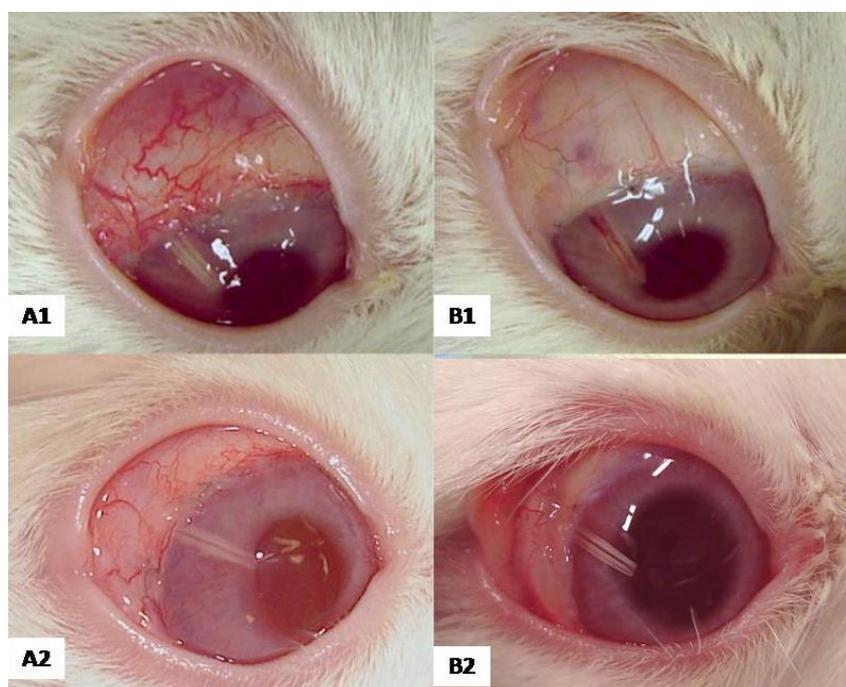
A avaliação morfológica da ampola cirúrgica foi realizada, de acordo com o *Moorfields Bleb Grading System* (WELLS et al., 2006) (Anexo B), pela análise da área (central e máxima), da altura e da vascularização da ampola cirúrgica, calculando a mediana de cada parâmetro, considerando o último dia de exame.

Dentre os parâmetros analisados, a área central (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $4,0 \pm 0,2$  vs  $4,0 \pm 0,2$  e A2 vs B2:  $2,0 \pm 0,3$  vs  $4,0 \pm 0,2$ ), a área máxima (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $4,0 \pm 0,2$  vs  $3,5 \pm 0,3$  e A2 vs B2:  $2,0 \pm 0,3$  vs  $3,0 \pm 0,1$ ) e a altura (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $2,0 \pm 0,3$  vs  $2,0 \pm 0,2$  e A2 vs B2:  $1,0 \pm 0,1$  vs  $2,0 \pm 0,2$ ) dos grupos tratados (B1 e B2) apresentaram tendência a maiores escores, porém com significância estatística apenas entre os grupos avaliados com 15 dias (A2 e B2) (área central com  $p=0,0004$ , área máxima com  $p=0,0007$  e altura com  $p=0,0239$ ). Em relação ao parâmetro vascularização, o grupo B apresentou escores significativamente menores, estatisticamente, em relação ao grupo A no 5º DPO (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $4,0 \pm 0,1$  vs  $3,0 \pm 0,1$ ;  $p<0,0001$ ) e no

15º DPO (mediana  $\pm$  erro padrão: A2 vs B2:  $3,0 \pm 0,1$  vs  $2,0 \pm 0,1$ ;  $p=0,0011$ ) (Tabela 2 e Figura 12).

**Tabela 2:** Distribuição da mediana de escores  $\pm$  erro padrão dos parâmetros avaliados relativos a características da ampola filtrante (de acordo com o *Moorfields Bleb Grading System*) e média da fórmula  $\Delta$ PIO  $\pm$  erro padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. A1 e B1 avaliados no 5º DPO; A2 e B2 avaliados no 15º DPO.

| Grupos      | Área central   | Área máxima    | Altura         | Vascularização     | $\Delta$ PIO        |
|-------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|---------------------|
| A1          | $4,0 \pm 0,2$  | $4,0 \pm 0,2$  | $2,0 \pm 0,3$  | $4,0 \pm 0,1$      | $-1,7 \pm 0,6$ mmHg |
| B1          | $4,0 \pm 0,2$  | $3,5 \pm 0,3$  | $2,0 \pm 0,2$  | $3,0 \pm 0,1$      | $-0,2 \pm 0,4$ mmHg |
| $p$ (valor) | <b>0,7216</b>  | <b>0,9069</b>  | <b>0,8188</b>  | <b>&lt;0,0001*</b> | <b>0,0842</b>       |
| A2          | $2,0 \pm 0,3$  | $2,0 \pm 0,3$  | $1,0 \pm 0,1$  | $3,0 \pm 0,1$      | $-0,8 \pm 0,3$ mmHg |
| B2          | $4,0 \pm 0,2$  | $3,0 \pm 0,1$  | $2,0 \pm 0,2$  | $2,0 \pm 0,1$      | $-1,4 \pm 0,3$ mmHg |
| $p$ (valor) | <b>0,0004*</b> | <b>0,0007*</b> | <b>0,0239*</b> | <b>0,0011*</b>     | <b>0,2256</b>       |



**Figura 12:** Fotografias demonstrando aspectos da ampola filtrante e do tubo de *sylvastic* dos diversos grupos de estudo, ao dia da eutanásia. Notar tendência de ampola mais difusa e alta no grupo tratado B2 e ampolas menos vascularizadas nos grupos tratados B1 e B2.

## 4.2 Complicações

Foram observadas as seguintes complicações (Figura 13):

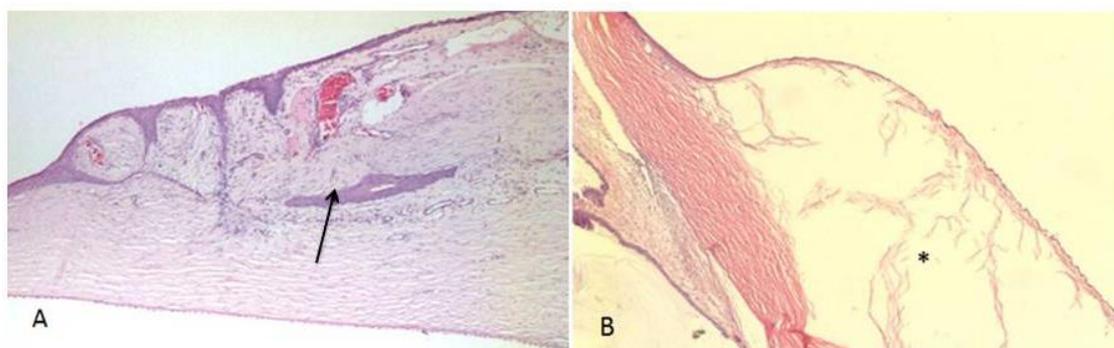
- Ruptura da cápsula anterior em um animal do grupo B2 (transcorreu com reação inflamatória do 1º ao 5º DPO) (Figura 13A);
- Atalamia em um animal do grupo A1 do 1º ao 2º DPO (Figura 13B);
- Discreto sangramento subconjuntival relacionado às injeções de tratamento nos seguintes animais: dois animais do grupo A1 e dois do grupo A2;
- Toque da extremidade distal do tubo no endotélio corneano, sem causar descompensação da córnea, em nove animais do grupo A1, três do grupo A2, dois do grupo B1 e em dois do grupo B2 (Figura 13C);
- Coágulo nas imediações do tubo em sete animais do grupo A1, um do grupo A2 e em cinco do grupo B1 (Figura 13 C e D).
- Sinéquia anterior nas imediações do tubo em três animais do grupo A1 e em um do grupo A2 (Figura 13E).



**Figura 13** (A) evolução, no 15º DPO, de lesão à cápsula anterior do cristalino (**seta**). (B) notar, no 3º DPO, a ampola filtrante mais elevada (**seta**) com vascularização aumentada, além da presença de sinéquia anterior ao redor do tubo. (C) presença de coágulo na base do tubo, próximo ao ângulo da câmara anterior, e o toque da extremidade distal do tubo no endotélio corneano. (D) evidência de coágulo na região distal do tubo (na câmara anterior). (E) presença de sinéquia anterior próxima à região distal de tubo (**seta**).

### 4.3 Avaliação histológica

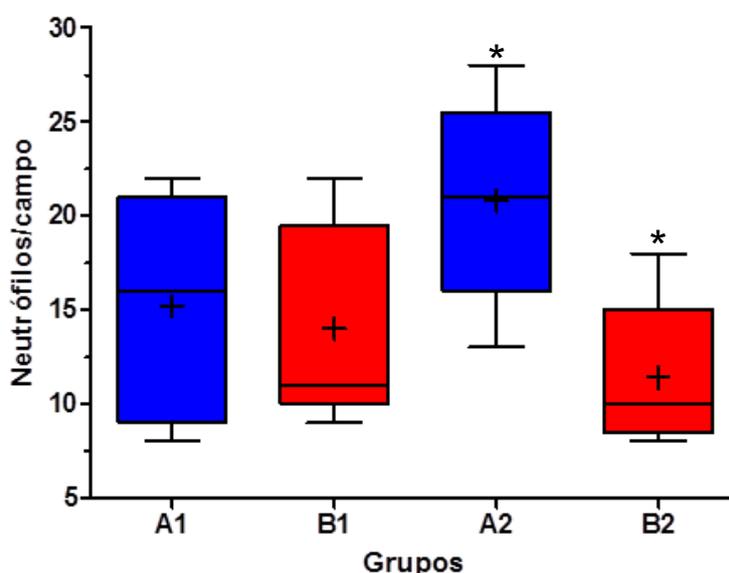
A avaliação histológica qualitativa, realizada por patologista experiente, mostrou ausência de diferenças significativas na conjuntiva, cápsula de Tenon e esclera, entre os grupos tratados ou não com o ácido rosmarínico. Ambos os grupos mostraram intensa deposição de colágeno a partir do quinto dia de estudo. Além disso, notou-se pouco e difuso edema, moderada infiltração inflamatória aguda e ausência de sinais de necrose tecidual em todos os grupos (Figura 14). Observou-se, ainda, algum material hialino em amostras do grupo B, que foi atribuído a resíduos da suspensão de ácido rosmarínico, previamente injetados nessas localizações.



**Figura 14:** Fotomicrografias da região limbar de dois animais do grupo A1 no 5º DPO. **(A)** sítio cirúrgico e o infiltrado inflamatório, além da presença de invaginação de tecido epitelial conjuntival (**seta**). **(B)** sítio cirúrgico (ampla ampola filtrante) (**asterisco**), além de menor infiltrado inflamatório e deposição inicial de colágeno (HE; magnificação original - 50x).

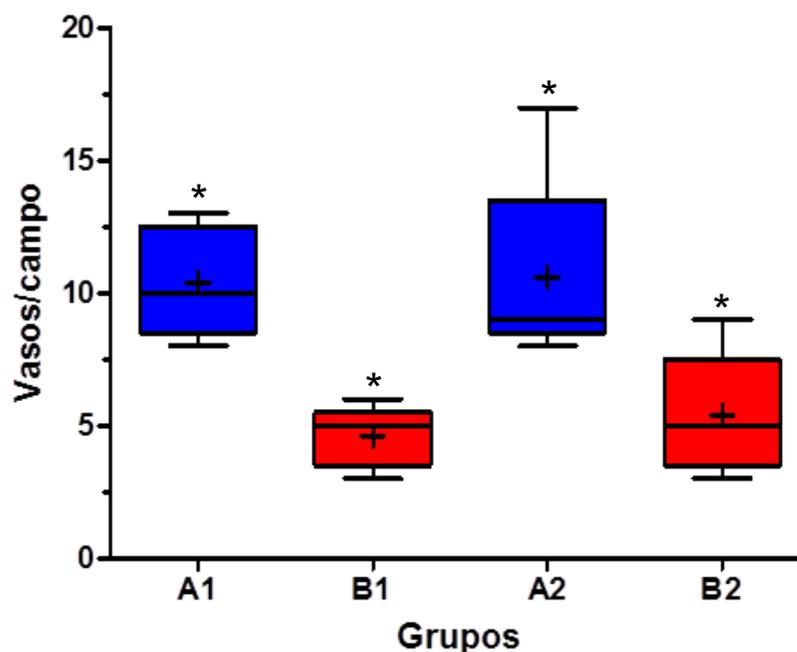
Assim, procedeu-se a contagem de neutrófilos e vasos sanguíneos no sítio cirúrgico, a avaliação quantitativa da deposição de colágeno (por meio de medidas da coloração com o *Sirius Red*), além da medida da marcação pela imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina e VEGF. A contagem de neutrófilos por

campo histológico, realizada por patologista experiente, evidenciou diminuição significativa no grupo tratado com o ácido rosmarínico, apenas na comparação entre os grupos A2 e B2 (mediana  $\pm$  erro padrão: 21,0  $\pm$  2,5 neutrófilos/campo vs 10,0  $\pm$  1,6 neutrófilos/campo;  $p=0,0159$ ), sendo A1 vs B1: 16,0  $\pm$  2,7 neutrófilos/campo vs 11,0  $\pm$  2,4 neutrófilos/campo com  $p=0,9166$  (Gráfico 3).



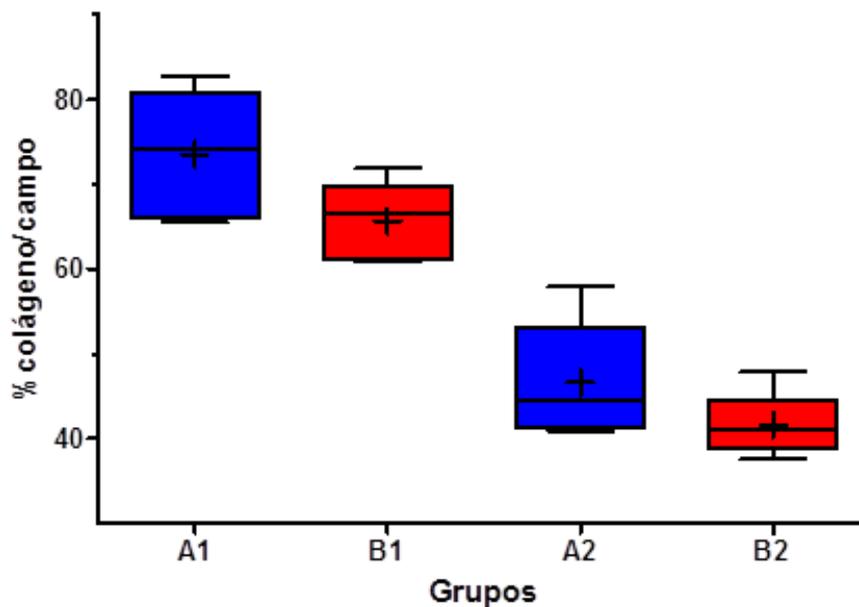
**Gráfico 3:** Distribuição dos valores de neutrófilos/campo na área cirúrgica dos olhos operados dos diversos grupos do estudo, ao dia da eutanásia (n=21). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p<0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. \* $p=0,0159$ .

O número médio de vasos sanguíneos por campo foi significativamente menor no grupo B em comparação ao grupo A, tanto com cinco DPO (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1: 10,0  $\pm$  0,9 vasos/campo vs 5,0  $\pm$  0,5 vasos/campo;  $p=0,0079$ ), quanto com 15 DPO (mediana  $\pm$  erro padrão: A2 vs B2: 9,0  $\pm$  1,6 vasos/campo vs 5,0  $\pm$  1,0 vasos/campo;  $p=0,0345$ ) (Gráfico 4 e Tabela 3).

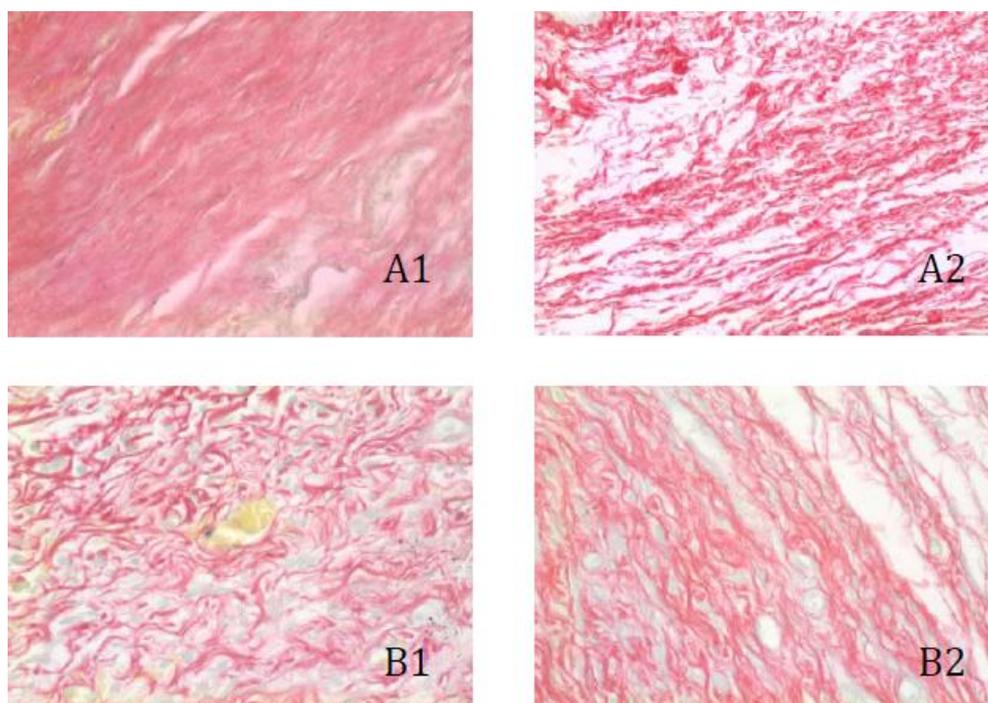


**Gráfico 4:** Distribuição da quantidade de vasos sanguíneos/campo na área cirúrgica dos olhos operados dos diversos grupos de estudo, ao dia da eutanásia (n=21). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.  
\*A1 vs B1:  $p=0,0079$ ; A2 vs B2:  $p=0,0345$ .

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação das medidas feitas pelo *software* ImageJ<sup>®</sup> 1.36, da coloração com *Sirius Red*, entre os grupos de estudo (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $74,22 \pm 3,38\%$  vs  $66,58 \pm 2,07\%$ ;  $p=0,2222$  e A2 vs B2:  $44,50 \pm 3,09\%$  vs  $41,13 \pm 1,70\%$ ;  $p=0,1508$ ) (Gráfico 5, Figura 15 e Tabela 3).



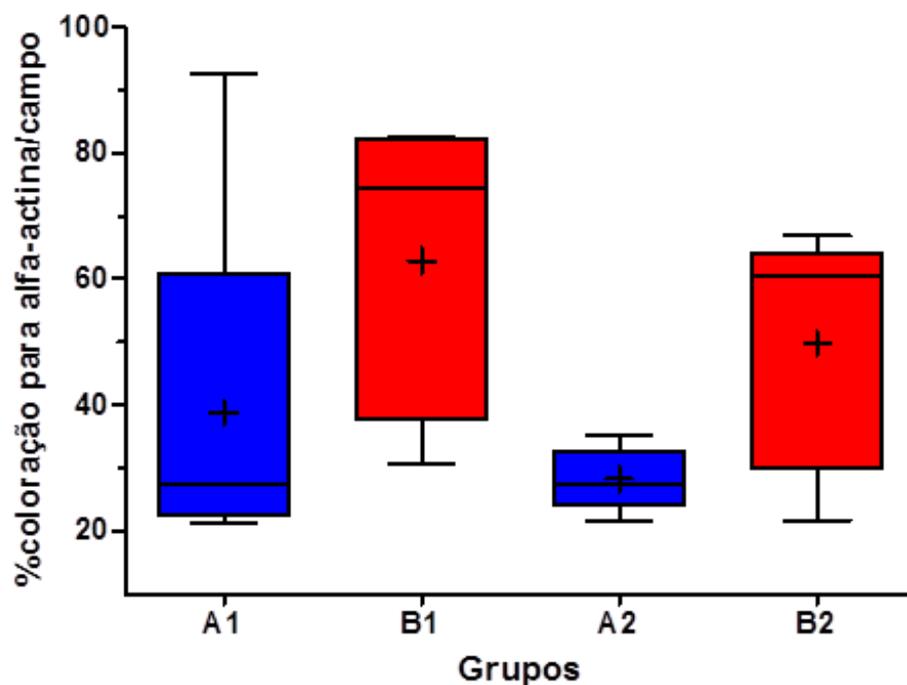
**Gráfico 5:** Gráfico de comparação dos grupos demonstrando os valores (%área) obtidos pelo *software ImageJ*® 1.36 para quantificação de colágeno corado pelo *Sirius Red* (n=21). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.



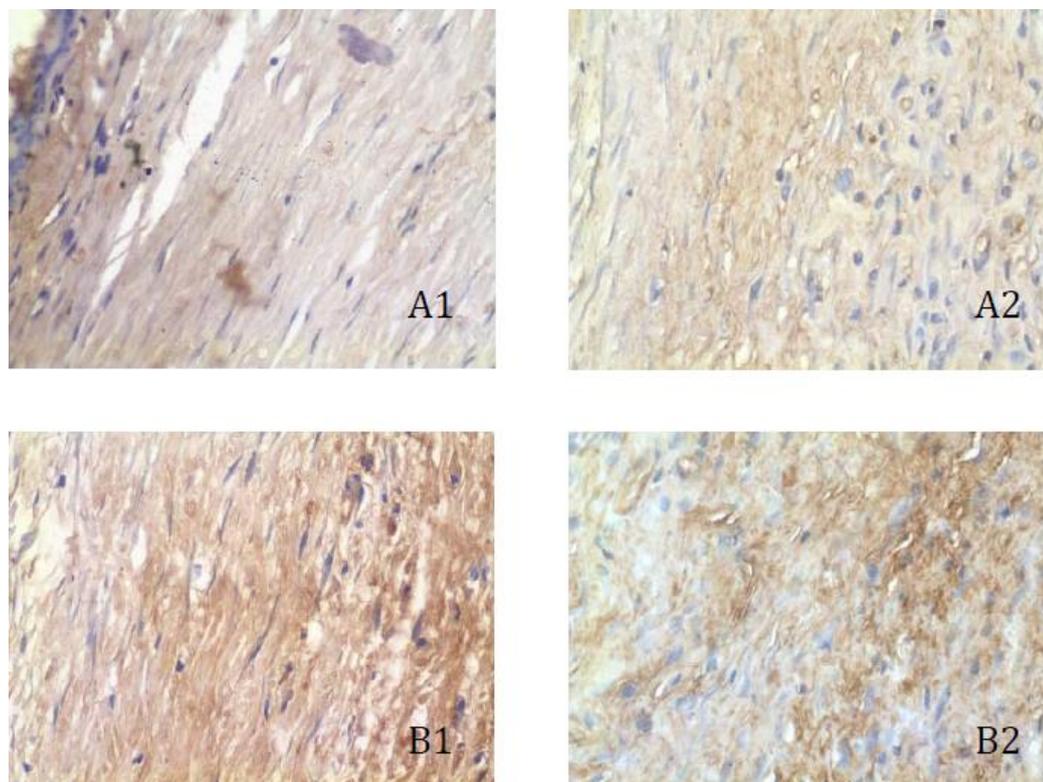
**Figura 15:** Fotomicrografias de exemplos de campos histológicos do sítio cirúrgico, mostrando áreas adjacentes ao tubo de *sylastic* implantado. Notar importante depósito de colágeno corado em tons de vermelho nos diversos grupos do estudo (*Sirius Red*; magnificação original - 400x).

#### 4.4 Avaliação imuno-histoquímica

Na avaliação imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA), dos campos histológicos da região do sítio cirúrgico, realizada pelo *software* ImageJ<sup>®</sup> 1.36, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos A1 e B1 (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1: 27,54  $\pm$  13,56% vs 74,28  $\pm$  10,58%;  $p=0,1508$ ) e entre A2 e B2 (mediana  $\pm$  erro padrão: A2 vs B2: 27,54  $\pm$  2,23% vs 60,63  $\pm$  8,54%;  $p=0,0952$ ) (Gráfico 6, Figura 16 e Tabela 3).



**Gráfico 6:** Gráfico de comparação dos grupos demonstrando os valores (%área) obtidos pelo *software* ImageJ® 1.36 da coloração imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA) (n=20). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

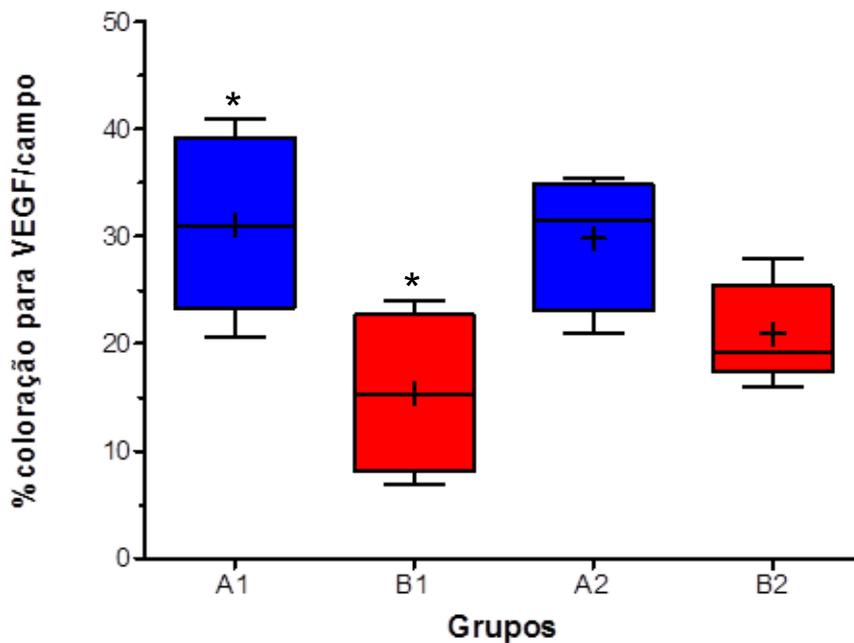


**Figura 16:** Fotomicrografias da imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina do sítio cirúrgico, mostrando áreas adjacentes ao tubo de *sylastic* implantado. Notar marcação fibroblástica em tons de castanho nos diversos grupos do estudo (Magnificação original - 400x).

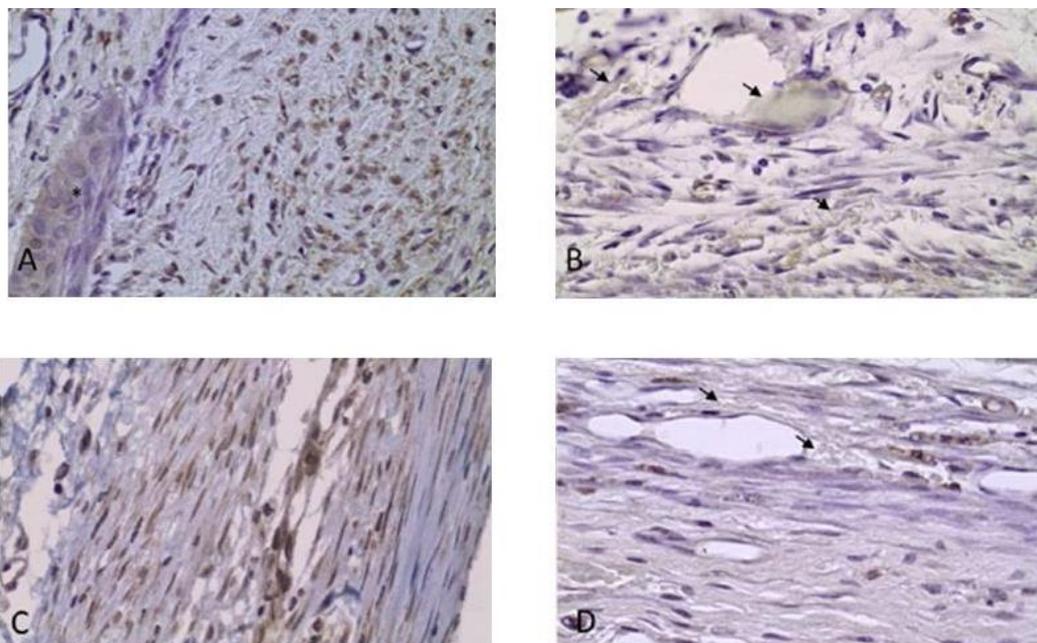
A análise imuno-histoquímica do VEGF no sítio cirúrgico revelou moderada coloração com anti-VEGF em todos os animais, principalmente em fibroblastos e células endoteliais presentes nos campos histológicos. Tomou-se o cuidado de se excluírem da contagem as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. Assim, a análise levou em consideração apenas os fibroblastos subconjuntivais e as células inflamatórias da coloração.

A avaliação do centro dos sítios cirúrgicos, com base em medições quantitativas da área de coloração, feita pelo *software* ImageJ<sup>®</sup> 1.36, mostrou que as ampolas filtrantes do grupo B, no 5<sup>o</sup> dia de pós-operatório, apresentaram estatisticamente menos coloração anti-VEGF do que o grupo A (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1: 30,91  $\pm$  3,23% vs 15,23  $\pm$  3,79%;

$p=0,0190$ ). Esta diferença não foi evidenciada em tecidos mais distantes da transição córneo-escleral. Muito embora a análise qualitativa da coloração com anti-VEGF, no 15º dia de pós-operatório, demonstre ser mais baixa no grupo B (mediana  $\pm$  erro padrão: A2 vs B2:  $31,41 \pm 3,18\%$  vs  $19,19 \pm 2,07\%$ ;  $p=0,0635$ ) (Gráfico 7, Figura 17 e Tabela 3), do ponto de vista estatístico esta diferença não foi significativa.



**Gráfico 7:** Gráfico de comparação dos grupos demonstrando os valores (%área) obtidos pelo *software* ImageJ® 1.36 da coloração imuno-histoquímica para VEGF (n=19). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. \* $p=0,0190$ .



**Figura 17:** Coloração imuno-histoquímica para VEGF em áreas dentro dos sítios cirúrgicos. Notar maior número de fibroblastos e de células inflamatórias coradas no grupo A1 (**A**) do que no grupo B1 (**B**). Uma invaginação do epitélio conjuntival é visível em (**A**), com coloração muito fraca anti-VEGF (**asterisco**). Material hialino (resíduos de ácido rosmarínico) é evidente em (**B**) (**setas**). Podem ser observados achados semelhantes no grupo A2 (**C**) e no grupo B2 (**D**), incluindo a presença de material hialino em (**D**) (**setas**) (Magnificação original - 400x).

#### 4.5 Expressão gênica por RT-PCR em tempo real

A análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real do TGF- $\beta_2$  não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $0,69 \pm 0,36$  vs  $1,05 \pm 0,45$ ;  $p=0,3095$  e A2 vs B2:  $1,16 \pm 0,35$  vs  $2,00 \pm 0,14$ ;  $p=0,1508$ ) (Gráfico 8A e Tabela 3). A análise para o colágeno tipo 1 alfa-1 (COL1A1) também não foi estatisticamente significativa na comparação entre os grupos de cinco dias, apesar do grupo B1 revelar valores mais elevados (mediana  $\pm$  erro padrão: A1 vs B1:  $1,58 \pm 1,98$  vs  $5,99 \pm 4,54$ ;  $p=0,3095$ ). No entanto, na comparação entre os grupos de 15 dias, houve

diferença estatisticamente significativa (mediana  $\pm$  erro padrão: A2 vs B2:  $1,20 \pm 0,36$  vs  $4,28 \pm 1,54$ ;  $p=0,0159$ ) (Gráfico 8B e Tabela 3).

**Tabela 3:** Distribuição da mediana  $\pm$  erro padrão dos parâmetros estudados relativos a fatores envolvidos na fibrogênese tecidual (coloração por *Sirius Red*, imunohistoquímica para  $\alpha$ -actina e RT-PCR em tempo real para TGF- $\beta_2$  e COL1A1) e na angiogênese (imunohistoquímica para VEGF e contagem de vasos/campo) da ampola de filtração nos diversos grupos de estudo. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

| Grupos   | <i>Sirius Red</i> | $\alpha$ -actina   | TGF- $\beta_2$    | COL1A1            | VEGF              | Vasos/campo    |
|----------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| A1       | 74,22 $\pm$ 3,38% | 27,54 $\pm$ 13,56% | 0,69 $\pm$ 0,36UA | 1,58 $\pm$ 1,98UA | 30,91 $\pm$ 3,23% | 10,0 $\pm$ 0,9 |
| B1       | 66,58 $\pm$ 2,07% | 74,28 $\pm$ 10,58% | 1,05 $\pm$ 0,45UA | 5,99 $\pm$ 4,54UA | 15,23 $\pm$ 3,79% | 5,0 $\pm$ 0,5  |
| <i>p</i> | <b>0,2222</b>     | <b>0,1508</b>      | <b>0,3095</b>     | <b>0,3095</b>     | <b>0,0190*</b>    | <b>0,0079*</b> |
| A2       | 44,50 $\pm$ 3,09% | 27,54 $\pm$ 2,23%  | 1,16 $\pm$ 0,35UA | 1,20 $\pm$ 0,36UA | 31,41 $\pm$ 3,18% | 9,0 $\pm$ 1,6  |
| B2       | 41,13 $\pm$ 1,70% | 60,63 $\pm$ 8,54%  | 2,00 $\pm$ 0,14UA | 4,28 $\pm$ 1,54UA | 19,19 $\pm$ 2,07% | 5,0 $\pm$ 1,0  |
| <i>p</i> | <b>0,1508</b>     | <b>0,0952</b>      | <b>0,1508</b>     | <b>0,0159*</b>    | <b>0,0635</b>     | <b>0,0345*</b> |

Gráfico 8A

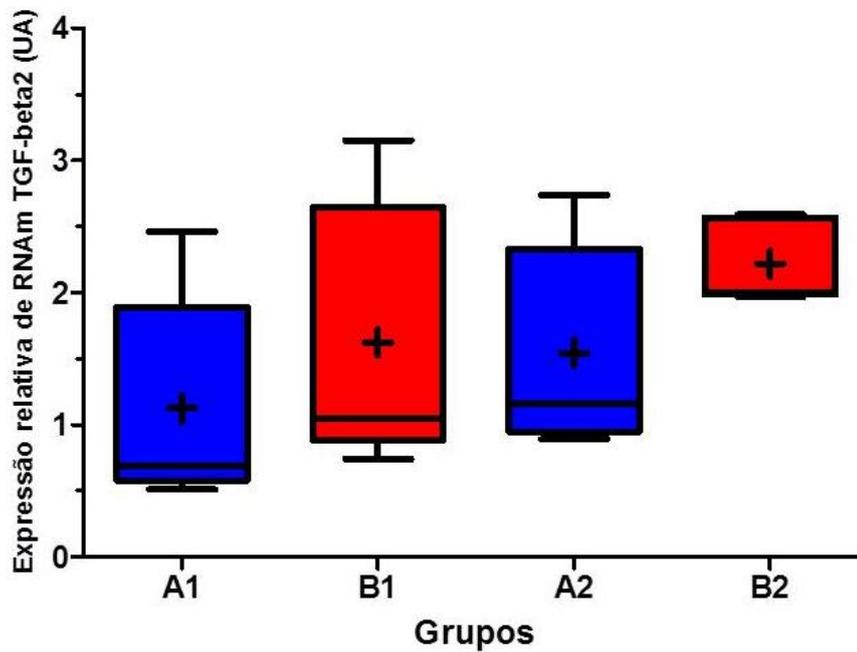
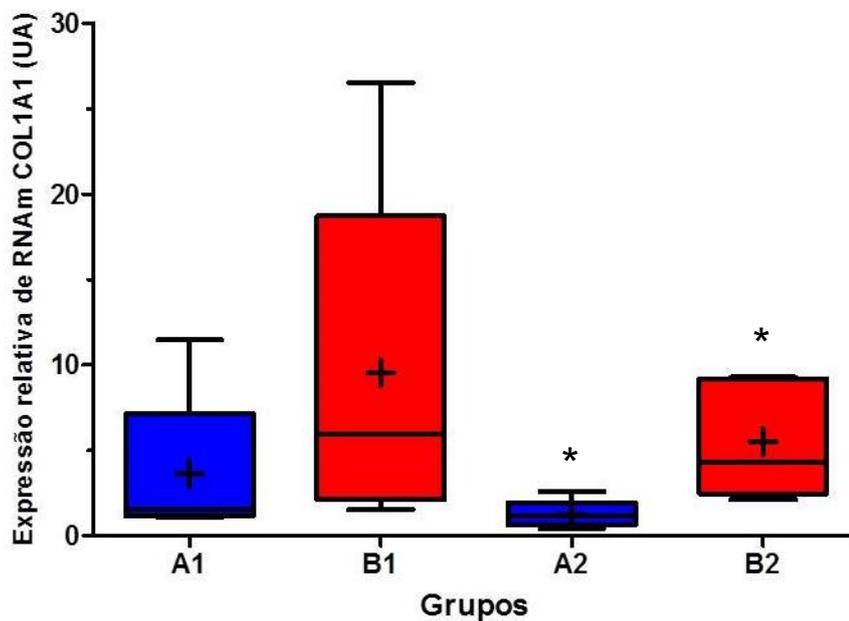


Gráfico 8B



**Gráficos 8:** Gráficos de comparação dos grupos demonstrando os valores obtidos pelo RT-PCR em tempo real para TGF- $\beta_2$  (Gráfico 8A) para COL1A1 (Gráfico 8B) (n=20). Dados apresentados na forma de mediana (linha central) e média (cruz), percentis 25 e 75 (linhas inferiores e superiores, respectivamente) e traços inferiores e superiores, indicando os limites observados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. \* $p = 0,0159$ .

## ***5. Discussão***

---

A falência da cirurgia filtrante do glaucoma é atribuída principalmente à fibrose excessiva, o que envolve vários mediadores diferentes presentes antes e durante a reparação tecidual (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; POHLERS et al., 2009; WYNN; RAMALINGAM, 2012). O fibroblasto é o principal tipo celular envolvido, contribuindo para o acúmulo de MEC e fibrose. Além disso, participa da inflamação e da neovascularização observadas durante a cicatrização patológica de vários tecidos diferentes, incluindo o olho (CORDEIRO et al., 2000b; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; POHLERS et al., 2009).

Atualmente, existem duas opções de drogas moduladoras da cicatrização usadas nas cirurgias fistulizantes do glaucoma, a saber: o 5-FU e a MMC. Essas substâncias, apesar de potentes moduladores da fibrose no sítio cirúrgico, possuem alguns efeitos colaterais indesejáveis que põem em risco a visão, tais como: o desenvolvimento de ampolas filtrantes avasculares, com risco de vazamento de humor aquoso pela conjuntiva atrófica, hipotonia, atalamia, maculopatia hipotônica e endoftalmite infecciosa. Como consequência, a busca por novas drogas moduladoras da cicatrização, com menos efeitos colaterais, tem sido grande nos últimos tempos (LAMA; FECHTNER, 2003; SEIBOLD; SHERWOOD; KAHOOK, 2012).

O presente estudo é o primeiro a avaliar o efeito do ácido rosmarínico como adjuvante em cirurgia filtrante do glaucoma. Inicialmente, deve-se ressaltar que as complicações observadas em alguns animais durante os procedimentos experimentais (cirurgia e injeções subconjuntivais), como descrito nos resultados, foram controladas e aparentemente não interferiram nos resultados das avaliações clínicas e histopatológicas desses animais. Também, por não se verificar maior frequência das complicações nos olhos tratados com ácido rosmarínico, infere-se que seu uso, na concentração preconizada, não foi associado diretamente a complicações clinicamente observáveis.

O tratamento com o ácido rosmarínico, na concentração de 15 mg/ml, não revelou melhora clínica, em termos de medidas de PIO, entre os grupos de

estudo, apesar de demonstrar ampolas filtrantes maiores e mais elevadas no grupo tratado, de acordo com *Moorfields Bleb Grading System*.

Na prática clínica, o acompanhamento da ampola com a classificação morfológica padronizada pode ajudar a prever o resultado cirúrgico e fornecer informações sobre a necessidade de tratamento adicional (PICHT; GREHN, 1998). O *Moorfields Bleb Grading System*, sistema de classificação morfológica da ampola cirúrgica, foi o que demonstrou maior concordância na avaliação fotográfica das ampolas cirúrgicas em comparação com os outros sistemas disponíveis (CANTOR et al., 2003; PICHT; GREHN, 1998). Esse sistema parece representar adequadamente as ampolas que estão sendo codificadas para análise estatística em estudos clínicos. Foi selecionado para ser aplicado neste estudo por demonstrar maior detalhamento da vascularização da ampola cirúrgica em relação aos demais sistemas (WELLS et al., 2006, 2007).

Apesar de se mostrar insuficiente para a promoção de melhores resultados clínicos na avaliação da cirurgia antiglaucomatosa experimental em coelhos, primordialmente pela ausência de diferenças tonométricas entre os grupos, do ponto de vista de vascularização da ampola filtrante, segundo *Moorfields Bleb Grading System*, os grupos tratados com o ácido rosmarínico demonstraram menores escores, indicando efeito modulador vascular. Este efeito pode estar associado com sua ação inibitória da neovascularização, conforme descrito por outros autores (HUANG; ZHENG, 2006; JUNG et al., 2007; KIM et al., 2009). A possibilidade de que os escores avaliados tivessem sofrido influência de uma ação vasoconstrictora sobre os vasos conjuntivais fica afastada, uma vez que o ácido rosmarínico pode apresentar efeito vasodilatador paradoxal (ERSOY et al., 2008).

O mesmo protocolo de tratamento foi acompanhado de aumento, não estatisticamente significativo, em alguns fatores relacionados ao processo cicatricial aos cinco dias de pós-operatório (imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina e expressão do COL1A1), mas principalmente aos 15 dias de pós-operatório (imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina, e expressão do TGF- $\beta_2$  e do COL1A1). No

entanto, a expressão do COL1A1 após 15 dias mostrou-se significativamente aumentada no grupo que recebeu tratamento com o ácido rosmarínico.

A avaliação pelo *Sirius Red* revelou também alta deposição de colágeno em todos os grupos de experimento, sem diferenças significativas nos grupos tratados com o ácido rosmarínico. Esses achados corroboram com a avaliação qualitativa da fibrose da área cirúrgica, observada desde o experimento piloto. Levando em consideração que a análise do *Sirius Red* não foi realizada sob luz polarizada, que seria o ideal para a visualização de fibras colágenas de diferentes espessuras. No entanto, realizou-se, neste estudo, a padronização das fotomicrografias pelo software ImageJ<sup>®</sup> 1.36.

Esse aumento da deposição de colágeno e da expressão do TGF- $\beta$  e do COL1A1 no grupo tratado com o ácido rosmarínico estão em desacordo com estudos publicados anteriormente, que demonstraram a ação inibitória desta droga sobre a fibrose hepática e o TGF- $\beta_1$  (LI et al., 2010; ZHANG et al., 2011). Especula-se que a divergência dos presentes achados em relação aos estudos anteriores seja decorrente da forma de aplicação e da concentração aplicada. No estudo publicado por Li et al. (2010), por exemplo, a via de administração foi a intragástrica e foram usadas proporcionalmente menores concentrações. Além disso, o material hialino observado no presente estudo, em alguns cortes histológicos, é de origem desconhecida, mas pode representar resíduo de ácido rosmarínico. É possível que essa elevada concentração da droga (constituindo uma suspensão pouco homogênea) tenha levado à formação de um coloide no espaço subconjuntival, com efeito potencialmente fibrosante. Este aspecto não foi avaliado por instrumentos de descrição química, os quais poderão ser usados no futuro para associação causal desta deposição subconjuntival com a fibrose local observada.

Interessante ressaltar que o tratamento, dentro do protocolo exposto, levou à menor quantidade de neutrófilos por campo aos 15 dias de estudo e, também, menor quantidade de vasos sanguíneos por campo histológico no 5º e 15º DPO. Este último dado vem corroborar com a observação de menores escores para a vascularização da ampola filtrante e menor marcação com anti-VEGF nos grupos tratados com ácido rosmarínico.

A diminuição do número de neutrófilos no grupo tratado com o ácido rosmarínico corrobora com estudo publicado anteriormente, em que os autores evidenciaram que o tratamento com esta substância foi capaz de diminuir a reação inflamatória, com a redução do número de neutrófilos, além de diminuir a quantidade de IL-8 que estimula a migração de neutrófilos para o local da lesão, em modelo experimental de câncer de pele com ratos (OSAKABE et al., 2004). As demais propriedades anti-inflamatórias conhecidas baseiam-se na inibição de enzimas (lipoxigenases e cicloxigenases), na interferência na cascata do complemento (PETERSEN; SIMMONDS, 2003), inibição do recrutamento de macrófagos (QIAO et al., 2005) e na redução de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1) (SWARUP et al., 2007), aspectos não abordados no presente estudo.

A diferença comparativa na marcação para VEGF observada entre os grupos pode, de certa forma, refletir a importância dos fibroblastos na ativação da cascata angiogênica relacionada ao processo de cicatrização (FUJIWARA; MURAGAKI; OOSHIMA, 2005; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; LI et al., 2009). Além disso, também se poderia especular que o ácido rosmarínico atuaria como modulador da expressão do VEGF nos fibroblastos, inibindo pontos desconhecidos na cascata de sinalização do controle da secreção de VEGF. Estudos anteriores demonstraram que esta droga é capaz de diminuir a proliferação e a formação de tubos vasculares pelas células endoteliais, provavelmente relacionada com a sua atividade antioxidante, que resultou na inibição das espécies reativas de oxigênio associadas à expressão de VEGF (HUANG; ZHENG, 2006); ou o seu efeito antiproliferativo sobre os tecidos vasculares, através da interrupção do ciclo celular nas fases G0/G1 (MAKINO et al., 2000). Em modelo experimental de retinopatia da prematuridade, o ácido rosmarínico inibiu a neovascularização retiniana sem, no entanto, causar toxicidade tecidual (KIM et al., 2009). Ademais, está relacionado com a inibição da angiogênese patológica em tumor (JUNG et al., 2007).

Alguns agentes antiangiogênicos têm demonstrado efeitos inibitórios sobre a atividade de fibroblastos em diferentes estudos (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; STATON; REED; BROWN, 2009; WONG et al., 1994) e,

mais recentemente, o VEGF tem sido considerado como uma importante citocina a ser controlada, a fim de diminuir a proliferação e migração de fibroblastos e células inflamatórias (FUJIWARA; MURAGAKI; OOSHIMA, 2005; LI et al., 2009; MATHEW; BARTON, 2011; O'NEILL et al., 2010; VAN BERGEN et al., 2011; ZHANG et al., 2008). Além disso, os pacientes submetidos à TREC têm níveis elevados de VEGF no humor aquoso e vários estudos testaram anticorpos anti-VEGF como opção terapêutica para o atual tratamento adjuvante antiproliferativo (GREWAL et al., 2008; LI et al., 2009; MATHEW; BARTON, 2011; O'NEILL et al., 2010; PAULA et al., 2013; VAN BERGEN et al., 2011).

Como elevada atividade angiogênica de fibroblastos estimulados tem sido atribuída ao TGF- $\beta$  e ao VEGF, os futuros esforços devem se concentrar tanto no seu efeito parácrino como no autócrino (FUJIWARA; MURAGAKI; OOSHIMA, 2005; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Levando-se em consideração o número crescente de artigos focados em angiogênese como alvo para melhorar os resultados cirúrgicos de cirurgias filtrantes do glaucoma, novos inibidores da neovascularização devem ser avaliados, uma vez que os antifibróticos atuais (5-FU e MMC) têm efeitos adversos frequentes (LI et al., 2009; LUKOWSKI et al., 2013; MATHEW; BARTON, 2011; MEMARZADEH et al., 2009; PAULA et al., 2013; TURGUT et al., 2014, 2015).

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se especular que o ácido rosmarínico, na concentração de 15 mg/ml, tenha ação inibitória sobre a neovascularização relacionada com a cicatrização de feridas, todavia foi incapaz de controlar todos os passos relacionados com a fibrose subconjuntival em longo prazo. Além disso, a avaliação clínica (incluindo PIO) de modelos experimentais de cirurgia filtrante é geralmente limitada devido à fibrose precoce e mais agressiva em animais, em comparação com o observado em humanos (MILLER et al., 1989).

Devem-se levar, ainda, em consideração, as seguintes limitações metodológicas para o uso do ácido rosmarínico, com base neste estudo:

- Período relativamente curto de avaliação clínica e histológica;

- A necessidade de injeções subconjuntivais para garantir a disponibilidade do ácido rosmarínico;
- Análise limitada do processo inflamatório, incluindo citocinas e tipos celulares, presentes neste modelo experimental;
- Avaliação da ampola filtrante por apenas um pesquisador, que apesar de mascarado para a identificação dos grupos, poderia levar a um viés de observação. Ressalta-se, no entanto, que a pesquisadora foi previamente treinada e tinha experiência clínica com gradação de ampolas de TREC em humanos.

Tais achados apontam para os potenciais efeitos anti-inflamatórios e de modulação da neovascularização pelo ácido rosmarínico em cirurgias antiglaucomatosas, porém sem ação moduladora da fibrogênese. Considerando que esta droga não demonstrou efeito tóxico ao epitélio pigmentar da retina (KIM et al., 2009), mais estudos *in vitro* e *in vivo* serão necessários para elucidar o seu mecanismo de ação, além de ensaios clínicos para verificar a sua segurança e eficácia em cirurgia fistulizante do glaucoma em humanos.

## ***6. Conclusões***

---

---

Não se observou diferença significativa nos níveis da PIO entre os olhos tratados ou não com ácido rosmarínico. A comparação dos aspectos da ampola filtrante e da inflamação conjuntival, realizada por atribuição de escores do *Moorfields Bleb Grading System*, mostrou aumento significativo da área central, área máxima e altura da ampola nos olhos tratados com ácido rosmarínico apenas na avaliação de 15 dias; porém houve menor vascularização nos olhos tratados, tanto na avaliação de cinco quanto de 15 dias. Também não foram observadas complicações relacionadas ao tratamento com esta droga.

A resposta inflamatória, avaliada pela contagem de neutrófilos no sítio cirúrgico, foi significativamente menor em olhos tratados com ácido rosmarínico por 15 dias. Observou-se também, nos olhos tratados, menor quantidade de vasos/campo aos cinco e aos 15 dias, contudo menor marcação imuno-histoquímica para VEGF apenas aos cinco dias de tratamento. Embora a marcação imuno-histoquímica para  $\alpha$ -actina tenha sido maior nos grupos tratados, essa diferença não foi significativa. Além disso, a deposição de colágeno avaliada pela coloração com *Sirius Red* também não se mostrou diferente entre os grupos.

Na comparação da expressão gênica de fatores relacionados à fibrogênese tecidual, observou-se maior expressão de COL1A1 nos olhos tratados com ácido rosmarínico aos 15 dias. Não foram observadas diferenças significativas entre olhos tratados ou não com a droga na expressão de COL1A1 aos cinco dias, nem na expressão do TGF- $\beta$ 2 em nenhum dos tempos analisados.

## ***7. Referências Bibliográficas***

---

AGIS INVESTIGATORS. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 4. Comparison of treatment outcomes within race. Seven-year results. **Ophthalmology**, v. 105, n. 7, p. 1146-64, 1998.

AGIS INVESTIGATORS. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. **Am J Ophthalmol**, v. 130, n. 4, p. 429-40, 2000.

AGIS INVESTIGATORS. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 9. Comparison of glaucoma outcomes in black and white patients within treatment groups. **Am J Ophthalmol**, v. 132, n. 3, p. 311-20, 2001.

AKKAN, J. U.; CILSIM, S. Role of subconjunctival bevacizumab as an adjuvant to primary trabeculectomy: a prospective randomized comparative 1-year follow-up study. **J Glaucoma**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2015.

ALMASIEH, M. et al. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. **Prog Retin Eye Res**, v. 31, n. 2, p. 152-81, 2012.

ALMEIDA, G. V. DE; COHEN, R. **Glaucoma: história de uma doença**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2008. 440p.

AL-SEREITI, M.; ABU-AMER, K.; SEN, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian J Exp Biol**, v. 37, n. 2, p. 124-30, 1999.

AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY. **Preferred Practice Pattern® Guidelines. Primary open-angle glaucoma**. 2010. Disponível em: <[www.aao.org/ppp](http://www.aao.org/ppp)>. Acessado em 09 out 2014.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. D. (ORG). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. 388p.

ANG, M. et al. Evaluation of sustained release of PLC-loaded prednisolone acetate microfilm on postoperative inflammation in an experimental model of glaucoma filtration surgery. **Curr Eye Res**, v. 36, n. 12, p. 1123-8, 2011.

---

ARSHINOFF, S. A.; ALBIANI, D. A.; TAYLOR-LAPORTE, J. Intraocular pressure after bilateral cataract surgery using Healon, Healon5, and Healon GV. **J Cataract Refract Surg**, v. 28, n. 4, p. 617-25, 2002.

ARSLAN, S. et al. Modulation of postoperative scarring with tacrolimus and octreotide in experimental glaucoma filtration surgery. **Curr Eye Res**, v. 37, n. 3, p. 228-33, 2012.

BABA, S. et al. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. **Life Sci**, v. 75, n. 2, p. 165-78, 2004.

BAIR, J. S.; CHEN, C. W. Trabeculectomy with multiple applications of mitomycin-C in monkeys with experimental glaucoma. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 13, n. 2, p. 115-28, 1997.

BALAZS, E. A. et al. Hyaluronic acid and replacement of vitreous and aqueous humor. **Mod Probl Ophthalmol**, v. 10, n. 2, p. 3-21, 1972.

BAUDOQUIN, C. et al. Expression of inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. **Ophthalmology**, v. 101, n. 3, p. 454-60, 1994.

BILL A.; HELLSING K. Production and drainage of aqueous humor in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*). **Invest Ophthalmol**, v. 4, n. 5, p. 920-6, 1965.

BROADWAY, D. C. et al. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. II. The outcome of filtration surgery. **Arch Ophthalmol**, v. 112, n. 11, p. 1446-54, 1994.

BUDENZ, D. L. et al. Prevalence of glaucoma in an urban West African population: the Tema Eye Survey. **JAMA Ophthalmol**, v. 131, n. 5, p. 651-8, 2013.

---

BURGOYNE, C. F. et al. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. **Prog Retin Eye Res**, v. 24, n. 1, p. 39-73, 2005.

CAIRNS, J. E. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. **Am J Ophthalmol**, v. 66, n. 4, p. 673-9, 1968.

CANTOR, L. B. et al. Morphologic classification of filtering blebs after glaucoma filtration surgery: the Indiana Bleb Appearance Grading Scale. **Journal of glaucoma**, v. 12, p. 266–271, 2003.

CASSON, R. J. et al. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 40, p. 341-9, 2012.

CLEMENT, C. I.; BHARTIYA, S.; SHAARAWY, T. New perspectives on target intraocular pressure. **Surv Ophthalmol**, 59(6):615-26, 2014.

CHENG, G. et al. Direct effects of bevacizumab on rat conjunctival fibroblast. **Cell Biochem Biophys**, 2015. [Epub ahead of print].

CORDEIRO, M. F. et al. Effect of varying the mitomycin-c treatment area in glaucoma filtration surgery in the rabbit. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 38, n. 8, p. 1639-46, 1997.

CORDEIRO, M. F. et al. Modulating conjunctival wound healing. **Eye (Lond)**, v.14 n. Pt 3B. p. 536-47, 2000a.

CORDEIRO, M. F. et al. TGF-beta1, -beta2, and -beta3 in vitro: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n. 3, p. 756-63, 2000b.

COSTA, V. P. et al. O uso da mitomicina C em cirurgia combinada. **Arq Bras Oftalmol**, v. 62, n. 5, p. 577-80, 1999.

CUMBA, R. J. et al. Clinical outcomes of peripheral iridotomy in patients with the spectrum of chronic primary angle closure. **ISRN Ophthalmol**, v. 26, n. 2013, p. 828972, 2013.

DANDONA, L.; DANDONA, R. What is the global burden of visual impairment? **BMC Med**, v. 4, p. 6, 2006.

DOUGHTY, M. J.; ZAMAN, M. L. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. **Surv Ophthalmol**, v. 44, n. 5, p. 367-408, 2000.

EDERER, F.; GAASTERLAND, D. E.; SULLIVAN, E. K. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 1. Study design and methods and baseline characteristics of study patients. **Control Clin Trials.**, v. 15, n. 4, p. 299-325, 1994.

EDMUNDS, B. et al. The National Survey of Trabeculectomy. III. Early and late complications. **Eye (Lond)**, v. 16, n. 3, p. 297-303, 2002.

ELDALY, M. A. et al. Non-penetrating filtration surgery versus trabeculectomy for open-angle glaucoma. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 15, n. 2, p. CD007059, 2014

ELMALLAH, M. K.; ALLINGHAM, R. R. Genetics of glaucoma. In: SHAARAWY, T. M. et al. (Eds.). **Glaucoma volume 1: Medical diagnosis and therapy**. Saunders Elsevier, 2009. Cap. 22, p. 269-75.

ERSOY, S. et al. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. **Phytomedicine**, v. 15, n. 12, p. 1087-92, 2008.

EUROPEAN GLAUCOMA SOCIETY. **Terminology and guidelines for glaucoma**, 3ª Ed. 2008, 183p. Disponível em: [http://www.dansk-oftalmologisk-selskab.dk/Patientsforl%C3%B8b/EGS\\_Guidelines\\_English.pdf](http://www.dansk-oftalmologisk-selskab.dk/Patientsforl%C3%B8b/EGS_Guidelines_English.pdf). Acessado em 13 de outubro de 2014.

---

FAKHRAIE, G. et al. Short-term Results of Trabeculectomy Using Adjunctive Intracameral Bevacizumab: A Randomized Controlled Trial. **J Glaucoma**, 2014 [Epub ahead of print].

FECHTNER, R. D.; WEINREB, R. N. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. **Surv Ophthalmol**, v. 39, n. 1, p. 23-42, 1994.  
FELLMAN, R. Trabeculectomy. In: SHAARAWY, T. M. et al. (Eds.). **Glaucoma volume 2: Surgical management**. Saunders Elsevier, 2009. Cap. 70, 137p.

FENDI, L. I. et al. Meta-analysis of beta radiation augmentation for trabeculectomy - results in distinct ethnic groups. **Arq Bras Oftalmol**, v. 74, n. 4, p. 300-5, 2011.

FFSSG. Fluorouracil Filtering Surgery Study one-year follow-up. The Fluorouracil Filtering Surgery Study Group. **Am J Ophthalmol**, v. 108, n. 6, p. 625-35, 1989.

FFSSG. Five-year follow-up of the Fluorouracil Filtering Surgery Study. The Fluorouracil Filtering Surgery Study Group. **Am J Ophthalmol**, v. 121, n. 4, p. 349-66, 1996.

FOSTER, P. J. et al. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. **Br J Ophthalmol**, v. 86, n. 2, p. 238-42, 2002.

FRANKS, W. A.; HITCHINGS, R. A. Complications of 5--fluorouracil after trabeculectomy. **Eye (Lond)**, v. 5, n. Pt 4, p. 385-9, 1991.

FUJIWARA, M.; MURAGAKI, Y.; OOSHIMA, A. Upregulation of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor in cultured keloid fibroblasts: relevance to angiogenic activity. **Arch Dermatol Res**, v. 297, n. 4, p. 161-9, 2005.

FURTADO, M. A. et al. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutat Res**, v. 657, n. 2, p. 150-4, 2008.

GIANGIACOMO, J.; DUEKER, D. K.; ADELSTEIN, E. The effect of preoperative subconjunctival triamcinolone administration on glaucoma filtration. I. Trabeculectomy following subconjunctival triamcinolone. **Arch Ophthalmol**, v. 104, n. 6, p. 838-41, 1986.

GILLIES, M. C.; SU, T. Cytokines, fibrosis and failure of glaucoma filtering surgery. **Aust N Z J Ophthalmol**, v. 19, n. 4, p. 299-303, 1991.

GLAUCOMA LASER TRIAL RESEARCH GROUP. The Glaucoma Laser Trial (GLT) and glaucoma laser trial follow-up study: 7. Results. Glaucoma Laser Trial Research Group. **Am J Ophthalmol**, v. 120, n. 6, p. 718-31, 1995.

GORDON, M. O. et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. **Arch Ophthalmol**, v. 120, n. 6, p. 714-20; discussion 829-30, 2002.

GRESSEL, M. G.; PARRISH, R. K.; FOLBERG, R. 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery: I. An animal model. **Ophthalmology**, v. 91, n. 4, p. 378-83, 1984.

GREWAL, D. S. et al. Evaluation of subconjunctival bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy a pilot study. **Ophthalmology**, v. 115, n. 12, p. 2141-2145.e2, 2008.

HAMARD, P. Clinical key points. Gonioscopy. **J Fr Ophthalmol**, v. 30, n. 5 Pt 2, p. 3S43-6, 2007.

HAMARD, P. [What to do if the intraocular pressure measurement does not appear reliable]. **J Fr Ophthalmol**, v. 33, n. 4, p. 279-84, 2010.

HAWKER, M. J.; BROADWAY, D. C. Preoperative conjunctival health and trabeculectomy outcome. In: SHAARAWY, T. M. et al. (Eds.). **Glaucoma volume 2: Surgical management**. Philadelphia, EUA: Saunders Elsevier, 2009. Cap. 68, p. 87-93.

HAYNES, W. L.; ALWARD, W. L. Control of intraocular pressure after trabeculectomy. **Surv Ophthalmol**, v. 43, n. 4, p. 345-55, 1999.

---

HEIJL, A. et al. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. **Arch Ophthalmol**, v. 120, n. 10, p. 1268-79, 2002.

HENNIS, A. et al. Awareness of incident open-angle glaucoma in a population study: the Barbados Eye Studies. **Ophthalmology**, v. 114, n. 10, p. 1816-21, 2007.

HERSCHLER, J. Primate trabeculectomies with 5-fluorouracil collagen implants. **Am J Ophthalmol**, v. 110, n. 5, p. 579-80, 1990.

HIGGINBOTHAM, E. J. et al. Bleb-related endophthalmitis after trabeculectomy with mitomycin C. **Ophthalmology**, v. 103, p. 650-6, 1996.

HUANG, S.; ZHENG, R. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. **Cancer Lett**, v. 239, n. 2, p. 271-80, 2006.

ISHIDA, K. Update on results and complications of cyclophotocoagulation. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 24, n. 2, p. 102-10, 2013.

JAMPEL, H. D.; PASQUALE, L. R.; DIBERNARDO C. Hypotony maculopathy following trabeculectomy with mitomycin C. **Arch Ophthalmol**, v. 10, n. 8, p. 1049-50, 1992.

JONAS, J. B.; BUDDE, W. M.; PANDA-JONAS, S. Ophthalmoscopic evaluation of the optic nerve head. **Surv Ophthalmol**, v. 43, n. 4, p. 293-320, 1999.

JONAS, J. B. Optic disc photography in the diagnosis of glaucoma. In: SHAARAWY, T. M. et al. (Eds.). **Glaucoma Volume 1: Medical diagnosis and therapy**. Saunders Elsevier, 2009. Cap. 17, p. 213-23.

JONES, L. S.; SHETTY, R. K.; SPAETH, G. L. Trabeculectomy. In: CHEN, T. C. (Ed.). **Surgical techniques in ophthalmology/glaucoma surgery**. Saunders Elsevier, 2008. v. 24, p. 5.

JUNG, J. E. et al. Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8, p. 1780-7, 2007.

KASS, M. A. et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. **Arch Ophthalmol**, v. 120, n. 6, p. 701-13; discussion 829-30, 2002.

KENDALL, R. T.; FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Front Pharmacol**. v. 27, n. 5, p. 123, 2014.

KHAW, P. T. et al. Effect of beta radiation on proliferating human Tenon's capsule fibroblasts. **Br J Ophthalmol**., v. 75, n. 10, p. 580-3, 1991.

KHAW, P. T. et al. Five-minute treatments with fluorouracil, floxuridine, and mitomycin have long-term effects on human Tenon's capsule fibroblasts. **Arch Ophthalmol**, v. 110, n. 8, p. 1150-4, 1992.

KHAW, P. T. et al. Activation and suppression of fibroblast function. **Eye (Lond)**, v. 8, n. Pt 2, p. 188-95, 1994.

KHAW, P. T.; WELLS, A. P. Trabeculectomy in the UK: is there room for improvement? **Eye (Lond)**, v. 15, n. Pt 4, p. 437-8, 2001.

KHAW, P. T. et al. Modulation of wound healing after glaucoma surgery. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 12, n. 2, p. 143-8, 2001.

KHAW, P. et al. A phase III study of subconjunctival human anti-transforming growth factor beta(2) monoclonal antibody (CAT-152) to prevent scarring after first-time trabeculectomy. **Ophthalmology**, v. 114, n. 10, p. 1822-30, 2007.

KIM, H. K. et al. Rosmarinic acid down-regulates the LPS-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ ) via the MAPK pathway in bone-marrow derived dendritic cells. **Mol Cells**, v. 26, n. 6, p. 583-9, 2008.

KIM, J. H. et al. Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21(WAF1) expression. **Eur J Pharmacol**, v. 615, n. 1-3, p. 150-4, 2009.

KIRWAN, J. F. et al. Effect of beta radiation on success of glaucoma drainage surgery in South Africa: randomised controlled trial. **BMJ**. v. 333, n. 7575, p. 942, 2006.

KOTECHA, A.; LIM, S.; GARWAY-HEATH, D. Tonometry and intraocular pressure fluctuation. In: SHAARAWY, T. M. et al. (Eds.). **Glaucoma volume 1: Medical diagnosis and therapy**. Saunders Elsevier, 2009. p. 103-13.

KRAJČOVIČOVÁ, Z.; MELUŠ, V. Bioactivity and potential health benefits of rosmarinic acid. **University Review**, v. 7, n. 2, p. 8-14, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Eds.). Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: Robbins & Cotran (Eds.). **Patologia-bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2005. Cap. 3, p. 91-124.

LAMA, P. J.; FECHTNER, R. D. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. **Surv Ophthalmol**, v. 48, n. 3, p. 314-46, 2003.

LEITE, M. T.; SAKATA, L. M.; MEDEIROS, F. A. Managing glaucoma in developing countries. **Arq Bras Oftalmol**, v. 74, n. 2, p. 83-4, 2011.

LESKE, M. C. et al. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. **Arch Ophthalmol**, v. 121, n. 1, p. 48-56, 2003.

LESKE, M. C. et al. Risk factors for incident open-angle glaucoma: The Barbados Eye Studies. **Ophthalmology**, v. 115, n. 1, p. 85-93, 2008.

LI, G. S. et al. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3-4, p. 282-8, 2010.

---

LI, Z. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 11, p. 5217-25, 2009.

LICHTER, P. R. et al. Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery. **Ophthalmology**, v. 108, n. 11, p. 1943-53, 2001.

LOCKWOOD, A.; BROCCINI, S.; KHAW, P. T. New developments in the pharmacological modulation of wound healing after glaucoma filtration surgery. **Curr Opin Pharmacol**, v. 13, n. 1, p. 65-71, 2013.

LOPES, J. F. et al. Subconjunctival sodium hyaluronate 2.3% in trabeculectomy: a prospective randomized clinical trial. **Ophthalmology**, v. 113, n. 5, p. 756-60, 2006.

LÜKE, J. et al. The effect of adjuvant dimethylenastron, a mitotic Kinesin Eg5 inhibitor, in experimental glaucoma filtration surgery. **Curr Eye Res**, v. 35, n. 12, p. 1090-8, 2010.

LUKOWSKI, Z. L. et al. Prevention of ocular scarring after glaucoma filtering surgery using the monoclonal antibody LT1009 (Sonopcizumab) in a rabbit model. **J Glaucoma**, v. 22, n. 2, p. 145-51, 2013.

MAKINO, T. et al. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, n. 8, p. 1140-5, 2000.

MASTROPASQUA, L. et al. Conjunctival modifications induced by medical and surgical therapies in patients with glaucoma. **Curr Op Pharmacol**, v. 13, n. 1, p. 56-64, 2013.

MATHEW, R.; BARTON, K. Anti-vascular endothelial growth factor therapy in glaucoma filtration surgery. **Am J Ophthalmol**, v. 152, n. 1, p. 10-5, 2011.

MCGUIGAN, L. J.; COOK, D. J.; YABLONSKI, M. E. Dexamethasone, D-penicillamine, and glaucoma filter surgery in rabbits. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 27, n. 12, p. 1755-7, 1986.

---

MCGUIGAN, L. J. et al. D-penicillamine and beta-aminopropionitrile effects on experimental filtering surgery. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 28, n. 10, p. 1625-9, 1987.

MEDEIROS, F. A et al. Corneal thickness as a risk factor for visual field loss in patients with preperimetric glaucomatous optic neuropathy. **Am J Ophthalmol**, v. 136, n. 5, p. 805-13, 2003.

MÉGEVAND, G. S. et al. The effect of reducing the exposure time of mitomycin C in glaucoma filtering surgery. **Ophthalmology**, v. 102, n. 1, p. 84-90, 1995.

MELLO, P. A.; TEIXEIRA, S. H. Trabeculectomia: evolução da técnica. In: MELLO, P. A.; SUSANNA JR, R.; ALMEIDA, H. G. DE (Eds.). **Série oftalmologia brasileira glaucoma**. 3. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2013. p. 461-70.

MEMARZADEH, F. et al. Postoperative use of bevacizumab as an antifibrotic agent in glaucoma filtration surgery in the rabbit. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 7, p. 3233-7, 2009.

MILLER, M. H. et al. Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. **Ophthalmic Surg**, v. 20, n. 5, p. 350-7, 1989.

MIN, J. et al. Prevention of ocular scarring post glaucoma filtration surgery using the inflammatory cell and platelet binding modulator saratin in a rabbit model. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35627, 2012a.

MIN, J. et al. Comparison of single versus multiple injections of the protein saratin for prolonging bleb survival in a rabbit model. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 12, p. 7625-30, 2012b.

NG, W. S.; ANG, G. S.; AZUARA-BLANCO, A. Laser peripheral iridoplasty for angle-closure. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD006746, 2012.

NGUYEN, K. D.; LEE, D. A. Effect of steroids and nonsteroidal antiinflammatory agents on human ocular fibroblast. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 33, n. 9, p. 2693-701, 1992.

NOURI-MAHDAVI, K. et al. Predictive factors for glaucomatous visual field progression in the Advanced Glaucoma Intervention Study. **Ophthalmology**, v. 111, n. 9, p. 1627-35, 2004.

NOURI-MAHDAVI, K. et al. Detection of visual field progression in glaucoma with standard achromatic perimetry: a review and practical implications. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 249, n. 11, p. 1593-616, 2011.

NOURI-MAHDAVI, K.; CAPRIOLI, J. Measuring rates of structural and functional change in glaucoma. **Br J Ophthalmol**. pii: bjophthalmol-2014-305210, 2014. [Epub ahead of print].

NUYTS, R. M. et al. Histopathologic effects of mitomycin C after trabeculectomy in human glaucomatous eyes with persistent hypotony. **Am J Ophthalmol**, v. 118, n. 2, p. 225-37, 1994.

O'NEILL, E. C. et al. Antifibrotic activity of bevacizumab on human Tenon's fibroblasts in vitro. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 51, n. 12, p. 6524-32, 2010.

OSAKABE, N. et al. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 549-57, 2004.

OZGONUL, C.; MUMCUOGLU, T.; GUNAL, A. The effect of bevacizumab on wound healing modulation in an experimental trabeculectomy model. **Curr Eye Res**, v. 39, n. 5, p. 451-9, 2014.

PASCOLINI, D.; MARIOTTI, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. **Br J Ophthalmol**, v. 96, n. 5, p. 614-8, 2012.

PASQUALE, L. R. et al. Effect of topical mitomycin C on glaucoma filtration surgery in monkeys. **Ophthalmology**, v. 99, n. 1, p. 14-8, 1992.

PAULA, J. S. DE. **Fatores relacionados ao sucesso nos tratamentos clínico e cirúrgico do glaucoma**. 2012. f. Tese (Livre Docência em Oftamologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PAULA, J. S. et al. Bevacizumab-Loaded polyurethane subconjunctival implants: effects on experimental glaucoma filtration surgery. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 29, n. 6, p. 566-73, 2013.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-5, 2003.

PICHT, G.; GREHN, F. Classification of filtering blebs in trabeculectomy: biomicroscopy and functionality. **Current opinion in ophthalmology**, v. 9, p. 2-8, 1998.

PINTO, C. E. DE C.; ROCHA, C. **O animal como modelo experimental - Disciplina de animais de laboratório - Universidade Federal Fluminense.** (sd.) Disponível em: <<http://www.uff.br/animaislab/ap1.doc>>. Acessado em 05 nov 2014.

POHLERS, D. et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 8, p. 746-56, 2009.

QIAO, S. et al. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. **Free Radic Res**, v. 39, n. 9, p. 995-1003, 2005.

QUIGLEY, H. A. Number of people with glaucoma worldwide. **Br J Ophthalmol.**, v. 80, p. 389-93, 1996.

QUIGLEY, H. A.; BROMAN, A. T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. **Br J Ophthalmol**, v. 90, p. 262-7, 2006.

RAY, K.; MOOKHERJEE, S. Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. **J Genet**, v. 88, n. 4, p. 451-67, 2009.

REHMAN, S. U. et al. Randomized controlled clinical trial of beta irradiation as an adjunct to trabeculectomy in open-angle glaucoma. **Ophthalmology**, v. 109, n. 2, p. 302-6, 2002.

RESNIKOFF, S. et al. Global data on visual impairment in the year 2002. **Bull World Health Organ.**, v. 82, p. 844-51, 2004.

RIBEIRO, V. R. C. **Efeito do uso de implantes de liberação lenta de Bevacizumabe na trabeculectomia experimental de coelhos**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

ROSSI, F. et al. Protective effect of heliotropium foertherianum (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 1, p. 33-40, 2012.

ROTCHFORD, A. P. et al. Temba glaucoma study: a population-based cross-sectional survey in urban South Africa. **Ophthalmology**, v. 110, n. 2, p. 376-82, 2003.

RULLI, E. et al. Efficacy and safety of trabeculectomy vs nonpenetrating surgical procedures: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Ophthalmol**, v. 131, n. 12, p. 1573-82, 2013.

SAKATA, K. et al. Prevalence of glaucoma in a South Brazilian population: Projeto Glaucoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 48, n. 11, p. 4974-9, 2007.

SALMON, J. F. Gonioscopy. In: SHAARAWY, T. M. et al. (Eds.). **Glaucoma volume 1: Medical diagnosis and therapy**. Saunders Elsevier, 2009. p. 173-83.

SATHYAMANGALAM, R. V. et al. Determinants of glaucoma awareness and knowledge in urban Chennai. **Indian J Ophthalmol**, v. 57, n. 5, p. 355-60, 2009.

SCHIMITI, R. B.; COSTA, V. P. Anatomia do globo ocular. In: MELLO, P. A. DE A.; SUSANNA JR, R.; ALMEIDA, H. G. DE (Eds.). **Série oftalmologia brasileira glaucoma**. 3. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2013. v. 21, p. 3-10.

SCHNYDER, C. C. et al. Comparative study of administration time of mitomycin C in trabeculectomy: 2.5 or 5 minutes?. **Klin Monbl Augenheilkd**, v. 206, n. 5, p. 307-11, 1995.

SEET, L. F. et al. Validation of the glaucoma filtration surgical mouse model for antifibrotic drug evaluation. **Mol Med**, v. 17, n. 5-6, p. 557-67, 2011.

SEIBOLD, L. K.; SHERWOOD, M. B.; KAHOOK, M. Y. Wound modulation after filtration surgery. **Surv Ophthalmol**, v. 57, n. 6, p. 530-50, 2012.

SEIDEL E. Weitere experimentelle untersuchungen über die quelle und den Verlauf der intraokularen Saftströmung. IX Mitteilung Über den abfluss des Kammerwassers aus der vorderen augenKammer. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 104, p. 357–402, 1921.

SHAPIRO, M. S. et al. 5-Fluorouracil toxicity to the ocular surface epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 26, n. 4, p. 580-3, 1985.

SHARAAWY, T.; BHARTIYA, S. Surgical management of glaucoma: evolving paradigms. **Indian J Ophthalmol**, v. 59, Suppl, p. S123-30, 2011.

SHERWOOD, M. B. et al. A new model of glaucoma filtering surgery in the rat. **J Glaucoma**, v. 13, n. 5, p. 407-12, 2004.

SHOUMAN, A. A. M. et al. Methylcellulose, a healing inhibitor factor in an animal model of trabeculectomy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 6, p. 2515-9, 2006.

SIGMA ALDRICH. **Rosmarinic acid**. [sd.]. Disponível em [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/536954?lang=pt&region=BR&cm\\_sp=abstract\\_-21041086\\_-536954](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/536954?lang=pt&region=BR&cm_sp=abstract_-21041086_-536954). Acessado em 24 nov 2014.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v. 341, n. 10, p. 738-46, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE GLAUCOMA. **3º consenso brasileiro de glaucoma primário de ângulo aberto**. 3. ed. São Paulo: BestPoint Editora, 2009. p. 97

SOOHOO, J. R. et al. Bleb morphology and histology in a rabbit model of glaucoma filtration surgery using Ozurdex<sup>®</sup> or mitomycin-C. **Mol Vis**, v. 18, p. 714-9, 2012.

STALMANS, I. et al. Safe trabeculectomy technique: long term outcome. **Br J Ophthalmol**, v. 90, n. 1, p. 44-7, 2006.

STATON, C. A.; REED, M. W. R.; BROWN, N. J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. **Int J Exp Pathol**, v. 90, n. 3, p. 195-221, 2009.

SWARUP, V. et al. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 9, p. 3367-70, 2007.

SWIGRIS, J. J.; BROWN, K. K. Fibrose pulmonar idiopática: uma década de progressos. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 3, p. 249-60, 2006.

TAKAMOTO, M.; ARAIE, M. Genetics of primary open angle glaucoma. **Jpn J Ophthalmol**, v. 58, n. 1, p. 1-15, 2014.

TATHAM, A. J.; WEINREB, R. N.; MEDEIROS, F. A. Strategies for improving early detection of glaucoma: the combined structure-function index. **Clin Ophthalmol.**, v. 8, p. 611-21, 2014.

THORNTON, I.; XU, M.; KRUEGER, R. R. Comparison of standard (0.02%) and low dose (0.002%) mitomycin C in the prevention of corneal haze following surface ablation for myopia. **J Refract Surg**, v. 24, n. 1, p. S68-76, 2008.

TURGUT, B. et al. Topical infliximab for the suppression of wound healing following experimental glaucoma filtration surgery. **Drug Des Devel Ther.**, v. 8, p. 421-9, 2014.

TURGUT, B. et al. Impact of trastuzumab on wound healing in experimental glaucoma surgery. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 43, n. 1, p. 67-76, 2015.

VAN BERGEN, T. et al. The role of different VEGF isoforms in scar formation after glaucoma filtration surgery. **Exp Eye Res**, v. 93, n. 5, p. 689-99, 2011.

VAN BERGEN, T. et al. Improving patient outcomes following glaucoma surgery: state of the art and future perspectives. **Clin Ophthalmol**, v. 8, p. 857-67, 2014.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **J Int Med Res**, v. 37, n. 5, p. 1528-42, 2009.

WANG, F. et al. Inhibition of cell proliferation of Tenon's capsule fibroblast by S-phase kinase-interacting protein 2 targeting SiRNA through increasing p27 protein level. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 51, n. 3, p. 1475-82, 2010.

WANG, N. et al. Orbital cerebrospinal fluid space in glaucoma: the Beijing intracranial and intraocular pressure (iCOP) study. **Ophthalmology**, v. 119, n. 10, p. 2065-73.e1, 2012.

WANG, W. et al. Clinical study on interferon treatment of early scarring in filtering bleb. **Eye Sci**, v. 26, n. 4, p. 197-200, 2011 .

WEINREB, R. N.; AUNG, T.; MEDEIROS, F. A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. **JAMA**, v. 311, n. 18, p. 1901-11, 2014.

WELLS, A. P.; BUNCE, C.; KHAW, P. T. Flap and suture manipulation after trabeculectomy with adjustable sutures: titration of flow and intraocular pressure in guarded filtration surgery. **J Glaucoma**, v. 13, n. 5, p. 400-6, 2004.

WELLS, A. P. et al. Comparison of two clinical bleb grading systems. **Ophthalmology**, v. 113, p. 77-83, 2006.

WELLS, A. P. et al. Information loss in 2 bleb grading systems. **Journal of glaucoma**, v. 16, n. 2, p. 246-250, 2007.

WELLS, T.; WONG, T.; CROWSTON, J. G. Part B: Wound healing and bleb evaluation after trabeculectomy. In: SHAARAWY, T. M. et al. (Eds.). **Glaucoma volume 2: Surgical management**. Philadelphia, EUA: Saunders Elsevier, 2009. Cap. 79, p. 229-38.

WONG, J. et al. Modulation of human fibroblast activity by selected angiogenesis inhibitors. **Exp Eye Res**, v. 58, n. 4, p. 439-51, 1994.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Med**, v. 18, n. 7, p. 1028-40, 2012.

YE, H. et al. Cationic nano-copolymers mediated IKK $\beta$  targeting siRNA to modulate wound healing in a monkey model of glaucoma filtration surgery. **Mol Vis**, v. 26, n. 16, p. 2502-10, 2010.

ZHANG, G.-Y. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor expression in keloid fibroblasts by vector-mediated vascular endothelial growth factor shRNA: a therapeutic potential strategy for keloid. **Arch Dermatol Res**, v. 300, n. 4, p. 177-84, 2008.

ZHANG, J. J. et al. Rosmarinic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatic stellate cells. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 3, p. 343-8, 2011.

ZHONG, H. et al. Evaluation of pirfenidone as a new postoperative antiscarring agent in experimental glaucoma surgery. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 6, p. 3136-42, 2011.

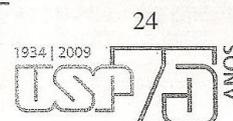
ZINSMEISTER, H. D.; BECKER, H.; EICHER, T. Moose, eine quelle biologisch aktiver naturstoffe? **Angew Chem**, v. 103, n. 2, p. 134-51, 1991.

## ***8. Anexos***

---

**ANEXO A****APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 124/2009, sobre o projeto intitulado “*Efeito de moduladores da cicatrização na trabeculectomia experimental em coelhos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Jayter Silva de Paula** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de *31 de agosto de 2009*.

(We certify that the protocol nº 124/2009, about “*Effect of Healing Modulators in Experimental Trabeculectomy in Rabbits*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in *08/31/2009* meeting.

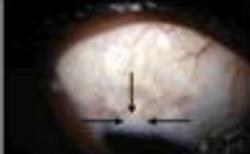
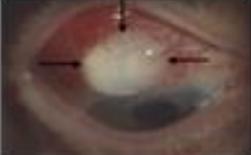
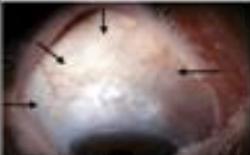
Ribeirão Preto, 31 de agosto de 2009.

**Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

# ANEXO B

## MOORFIELDS BLEB GRADING SYSTEM



| Área<br>a) Central  | Área<br>b) Máxima   | Altura  | Vascularização  |
|---|---|---|---|
| <br>1 (0%)    | <br>1 (0%)    | <br>1  | <br>1 (avascular) |
| <br>2 (25%)  | <br>2 (25%)  | <br>2 | <br>2 (normal)   |
| <br>3 (50%)  | <br>3 (50%)  | <br>3 | <br>3 (mild)     |
| <br>4 (75%)  | <br>4 (75%)  | <br>4 | <br>4 (moderate) |
| <br>5 (100%) | <br>5 (100%) |   | <br>5 (severe)   |

## ***Anexo de Publicação***

---

## RESEARCH REPORT

## Rosmarinic Acid Suppresses Subconjunctival Neovascularization in Experimental Glaucoma Surgery

Juliana de Lucena Martins Ferreira<sup>1</sup>, Fernando Chahud<sup>2</sup>, Leandra N. Ramalho<sup>2</sup>, Carolina Maria Modulo<sup>1</sup>, Lorena Carla Vieira<sup>3</sup>, Peter Sol Reinach<sup>1</sup>, Maria de Lourdes Veronese Rodrigues<sup>1</sup>, Armando Silva Cunha<sup>3</sup> and Jayter Silva Paula<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, <sup>2</sup>Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, and <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

## ABSTRACT

**Purpose:** Excessive subconjunctival scarring is associated with increased angiogenesis and leads to filtration failure in glaucoma surgery. In this study, we describe that rosmarinic acid (RA) has anti-angiogenic activity during wound healing in a rabbit model of glaucoma surgery.

**Methods:** Forty *New Zealand* rabbits underwent an experimental trabeculectomy and were randomly allocated into two treatment groups: RA group – treated with subconjunctival injections of 0.1 ml RA (15 mg/ml;  $n = 20$ ) – and control group – treated with subconjunctival injections of 0.1 ml balanced salt solution ( $n = 20$ ). The *in vivo* effect of RA was investigated after 5 and 15 d by measuring the intraocular pressure (IOP; with Tonopen) and bleb area and vascularity (using the Moorfields Bleb Grading System). Vascularization was also studied by counting histological blood vessels and by immunohistochemistry of vascular endothelial growth factor (VEGF) at the surgical site and by quantification of vessels in chicken's chorioallantoic membrane (CAM), treated with AR 500 µg/ml for 48 h.

**Results:** On the fifth day, eyes of RA group displayed higher bleb area ( $3.6 \pm 0.2$  versus  $1.8 \pm 0.2$ ;  $p = 0.004$ ) and lower vascularity ( $3.0 \pm 0.5$  versus  $4.0 \pm 0.4$ ;  $p = 0.009$ ) than controls; however, difference in IOP reduction was not significant ( $-1.4 \pm 0.3$  versus  $-0.8 \pm 0.3$  mmHg;  $p = 0.226$ ). Proportion of vessels/field ( $4.6 \pm 0.5$  versus  $10.4 \pm 0.9$ ;  $p = 0.008$ ) and VEGF immunostaining ( $15,347 \pm 3788$  versus  $31,043 \pm 3230$ ;  $p = 0.019$ ) also declined with RA treatment. However, at the 15th day, none of the parameters were different between the groups, except for vessels/field proportion ( $5.4 \pm 1.0$  versus  $10.6 \pm 1.6$ ;  $p = 0.035$ ). CAM exposed to AR inhibited vascularization ( $-45.67 \pm 4.74\%$ ;  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** These data indicate RA has a short-term anti-angiogenic effect and could be a potential modulator of neovascularization during subconjunctival healing at glaucoma filtration surgical sites.

**Keywords:** Filtration surgery, glaucoma, neovascularization, rosmarinic acid, wound healing

## INTRODUCTION

Prevention of optic nerve damage is the main objective of all current glaucoma treatment options, which are still based on intraocular pressure (IOP) reduction.<sup>1–3</sup> Glaucoma filtration surgeries are the

major alternative to medical treatment and have been specifically associated with decreases in visual fields progression rates.<sup>4,5</sup>

Surgical filtration failures are most associated with excessive fibrosis in subconjunctival tissues at the surgical site resulting in fibroblastic production of

Received 7 July 2014; revised 18 September 2014; accepted 20 October 2014; published online 9 December 2014

Correspondence: Jayter Silva Paula, MD, PhD, Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900 – 12<sup>o</sup>, Andar, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, Zip Code: 14049 – 900. Tel: 00 55 16 3602-2499. Fax: 00 55 16 3602-2860. E-mail: jspaula@fmrp.usp.br

1

2 J. L. M. Ferreira *et al.*

collagen and angiogenesis.<sup>6,7</sup> In fact, recent studies have investigated new therapies aimed at modulation of scarring with special attention being paid to control excessive neovascularization observed early post-operative period.<sup>7-10</sup> Moreover, routine anti-fibrotic agents used per-operatively to enhance outcomes of glaucoma filtration surgery are associated with diverse and potential severe post-operative eye complications.<sup>11-14</sup>

Rosmarinic acid (RA) is a naturally occurring polyphenol (ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid), found in species of the subfamily Nepetoideae (Lamiaceae), with several biological activities.<sup>15,16</sup> Its anti-oxidative effects result in inhibition of some steps in the angiogenesis cascade,<sup>17</sup> including in retinal endothelial cells.<sup>18</sup> Aiming to decrease neovascularization related to wound healing process, we show in this study that RA has the potential in rabbits to be used as an anti-angiogenic adjunctive agent in experimental glaucoma filtration surgery.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

This study included 40 female white New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), each weighing 2.0–2.5 kg. All animals were acquired from the Central Bioterium of the University of São Paulo (Ribeirão Preto Campus). The animals were housed in individual cages in an air-conditioned room (22°C–26°C) on a 12-h light–dark cycle. All of the rabbits were acclimatized for at least five days before the experiments started. The animals were fed standard rabbit chow, but were given only water 12 h before surgery. The study was approved by the Institutional Animal Experimentation Ethics Committee of Ribeirão Preto Medical School. Only one eye of the rabbits in the study groups was subjected to standard preparation for surgery, anesthesia and the surgical technique. All experiments and animal-related procedures were performed according to the guidelines for animal care and experimentation by the Association for Research in Vision and Ophthalmology as described in their Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research.

### Surgical Procedures

Prior to surgeries, all animals were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine 1 ml/kg solution (50 mg/ml) and 0.5 ml/kg xylazine (20 mg/ml). A conjunctival fornix peritomy procedure was performed in the right eye, and the sclera was exposed. A 2 × 2 mm limbal base flap with half of the thickness

of the sclera was performed close to the cornea. A paracentesis at the temporal side of the cornea was made, and a 22-gauge needle (22G Catheter Insyte, BD Insyte®, Becton Dickson Surgical Industry, São Paulo, Brazil) was used to penetrate the anterior chamber, under the scleral flap. A silastic tube was cut 1.0 mm from its insertion, trimmed, beveled and fixed on the scleral surface with nylon 10.0.<sup>19</sup> The scleral flap and conjunctiva were sutured with 10.0 nylon. All operated eyes were treated with a fixed combination of topical antibiotic (ciprofloxacin hydrochloride, 3.5 mg/g) and corticosteroid (dexamethasone, 1.0 mg/g) four times a day for five days.

### Treatment and Monitoring

RA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was diluted in 0.9% saline solution in order to obtain a final concentration of 15 mg/ml. Such concentration demonstrated best results in previous pilot tests from our laboratory (data not shown). Two different masked researchers performed separately treatment (C. M. M.) and clinical evaluation (J. L. M. F.) protocols. Animals were numbered and randomly allocated in two groups:

RA group: Subconjunctival injections of 0.1 ml RA solution was applied at the superior quadrant of right eye for three times – three days before, during and on each of three days after the surgical procedure, into the bleb ( $n=20$ ).

Control group: subconjunctival injection of 0.1 ml balanced salt solution was applied at the superior quadrant of the right eye for the same time points ( $n=20$ ).

Rabbits were assessed clinically just before surgery, at days 1, 5 and 15 post-operatively. In each evaluation, after topical anesthesia (proprilocaine 0.5% – two eye drops), IOP was measured in both eyes with Tonopen (Tonopen Avia, Reichert Inc., Depew, NY), and the following bleb findings were recorded: area (maximal), height and vascularity (which was classified according to Moorfields Bleb Grading System, MBGS<sup>20</sup>) and also complications. All animals were photographed by one individual (C. M. M.), and masked images of the treatment group were graded by another one (J. L. M. F.).

### Histological Analysis

On the 5th and 15th post-operative days, the rabbits were euthanized using intravenous pentobarbital (100–150 mg/kg). Upon sacrifice and enucleation, samples of the surgical site, including sclera, conjunctiva and Tenon's capsule were dissected and fixed with 10% buffered formalin. Preparation for routine histology was performed on paraffin, using hematoxylin and eosin staining. Photographs of

sections were made in order to evaluate microscopic fields of surgical site, at 200× magnification. Analysis of mean number of blood vessels was performed by counting all identified subconjunctival blood vessels in three sequential fields starting at the corneo-scleral transition, using five sequential slices. Blood vessel evaluation as well other histopathologic analyses of interest were performed by an experienced and masked ocular pathologist (F. C.).

### Immunohistochemistry for Vascular Endothelial Growth Factor

Immunohistochemical preparations for vascular endothelial growth factor (VEGF) were used in order to assess the amount of fibroblasts-expressing VEGF. The paraffin-embedded slides were heated to 60°C, deparaffinized and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was quenched by means of a 30-min incubation in a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/phosphate buffered solution (PBS) solution, washed and blocked with a solution of 20% Aquablock (East Coast Biologics, Inc., North Berwick, ME) in PBS/0.2% Tween-20 for 30 min. The sections were then incubated with a human anti-VEGF monoclonal antibody at a dilution of 1:50 (VEGF C-1; SC 7269, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Primary antibodies were detected using biotinylated IgG secondary antibodies (2 µg/ml), after which the sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB substrate kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). One 400× magnified microscopic field (centered at the scleral surgical site) of five slices for each animal was evaluated using Image J 1.36 (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD) software program for DAB brown analysis. We chose to withdraw staining from endothelial cells of vessels at the final DAB protocol analysis in order to avoid potential bias related to different number of vessels in selected microscopic fields.

### Chick Chorioallantoic Membrane Assay

The analysis of the antiangiogenic activity of AR was performed using chicken embryo for the chorioallantoic membrane (CAM) assay, modified from previous studies.<sup>21,22</sup> Embryonated eggs were kept incubated at 37°C and 60% humidity, using a digital automatic incubator. After 72 h, a circular eggshell aperture of approximately 1.0 cm was made, discarding non-viable eggs (not fertilized). CAM was exposed after withdrawing the inner membrane following by sealing of eggs with a masking tape. At the fifth day, 20 µl of RA solutions (250 or 500 µg/ml) were applied on 12 embryos. Negative controls were exposed to PBS (pH 7.4), as well as positive controls, to bevacizumab solution (an anti-VEGF agent, at 500 µg/mL) (*n* = 12).

### Rosmarinic Acid in Glaucoma Surgery 3

After seven days of incubation, CAM were extracted, fixated (3.7% formaldehyde) for 10 min and photographed. The images were analyzed based on measurements of proportion of blood vessels area in pixels (Image J 1.36 – National Institute of Health).

### Statistical Analysis

All analyses of the study were performed using the Prism 5.0 software program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The means, medians, proportions (percentages) and standard errors (SEs) were calculated using descriptive statistics. The Mann–Whitney *U* test was used to compare the results between groups. We calculated the power (1 – beta) of findings considering the difference and the standard deviation observed in the “blood vessels per field” parameter on the fifth day and assuming an alpha value of 0.05. *p* Values of less than 0.05 were considered as statistically significant.

### RESULTS

All operated eyes displayed diffuse blebs throughout the five days after filtration surgery; however, none were identifiable on the 15th postoperative day. On the fifth day, evaluation of blebs morphology using MBGS showed no significant difference between RA and control group, in terms of height (median ± SE: 2.0 ± 0.1 versus 2.0 ± 0.4). Interestingly, eyes from RA group presented with a higher bleb area (3.6 ± 0.2 versus 1.8 ± 0.2; *p* = 0.004) and less redness and significant lower vascularity (3.0 ± 0.2 versus 4.0 ± 0.2; *p* = 0.0089) than the control group (Figure 1). No significant difference in mean IOP was observed between groups on the fifth post-operative day (10.8 ± 0.7 mmHg versus 11.5 ± 0.4 mmHg for RA and control group, respectively). The clinical evaluations of the RA and control groups after 15 d were not different from one another.

Qualitative histological evaluation showed minimal differences between groups in terms of conjunctival epithelial layers, subconjunctival edema, leukocyte migration and gross contents of extracellular matrix attributed to collagen deposition. Some hyaline material was observed exclusively in RA group specimens, which was attributed to residuals of RA suspension previously injected in those regions. In addition, no signs of tissue necrosis were observed. Moreover, mean number of blood vessels per field was significantly lower in RA group than control group at 5th (4.6 ± 0.5 versus 10.4 ± 0.9 vessels/field; *p* = 0.0079) and 15th postoperative days (5.4 ± 1.0 versus 10.6 ± 1.6; *p* = 0.035). The differences observed were robust because power calculation for the paired comparison (*n* = 10 per group) at five days period was 0.99.

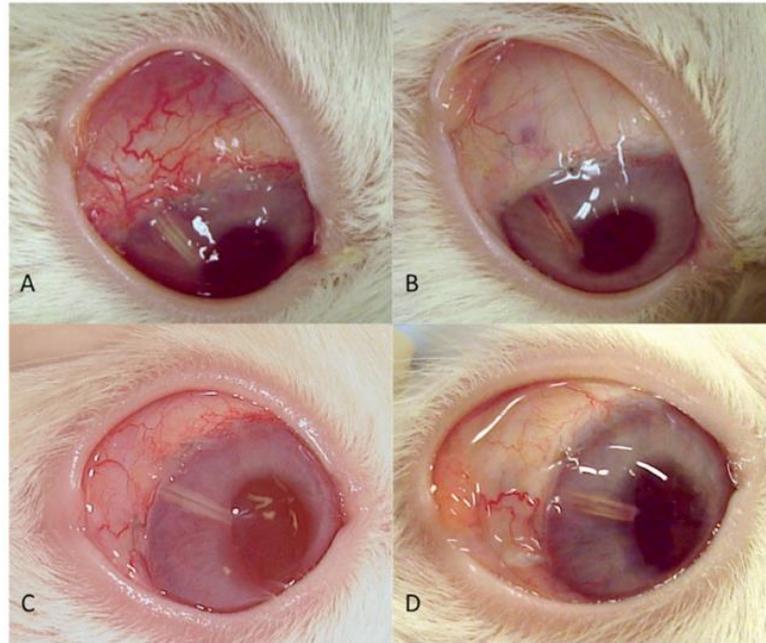
4 J. L. M. Ferreira *et al.*

FIGURE 1 Photographs showing the redness of surgical blebs on the fifth post-operative day in right eyes of rabbits which underwent experimental glaucoma surgery. (A) Control group: note diffuse, moderate high bleb with apparent vascularity (animal #2). (B) RA group example of animal #4, displaying also diffuse, moderate high blebs, but with minimal vascularity. Note flat blebs and almost similar vascularization on the 15th postoperative day in both control (C) and RA groups (D).

VEGF immunohistochemistry analysis of all sub-conjunctival tissues revealed moderate anti-VEGF staining in all animals, mainly in fibroblasts and endothelial cells. Evaluation of the center of surgical sites, based on quantitative measurements of staining area, showed that blebs of the RA group had less anti-VEGF staining than the control group ( $15.4 \pm 3.8\%$  versus  $31.0 \pm 3.2\%$ ;  $p = 0.019$ ) (Figure 2). This difference was not seen in tissues far from the cornea-scleral transition. Although qualitative analysis of anti-VEGF staining at the 15th day seems to be lower between groups (Figure 2), it was not significant.

RA treatment also resulted in a significant reduction of the CAM vessels percentage compared to controls at both concentrations ( $-32.0 \pm 1.1\%$  and  $-45.7 \pm 1.4\%$  for RA 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively;  $p < 0.001$ ), besides RA 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treatment reduced the vessel proportion more than bevacizumab 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $-13.7 \pm 1.3\%$ ;  $p = 0.008$ ) (Figure 3).

## DISCUSSION

Failure of glaucoma filtration surgery is mainly attributed to excessive fibrosis, which involves several

different mediators present before and during wound repair.<sup>23-25</sup> Fibroblasts are the major cell type contributing to fibrotic accumulation of extracellular matrix, besides their involvement in inflammation and neovascularization observed during pathological wound healing of several different tissues including the eye.<sup>23,25-28</sup>

Some anti-angiogenic agents have demonstrated inhibitory effects on fibroblasts activity in different studies,<sup>7,23,29</sup> and more recently VEGF has been considered an important target cytokine to be controlled in order to decrease proliferation and migration of fibroblasts and inflammatory cells.<sup>30-35</sup> Moreover, patients who underwent trabeculectomy have elevated levels of aqueous VEGF, and several studies tested anti-VEGF antibodies as a therapeutic option to current antiproliferative adjuvant treatments.<sup>30,33-37</sup>

As high angiogenic activity of stimulated fibroblasts has been attributed to TGF- $\beta$  and VEGF, future efforts should focus on both their paracrine and autocrine effects.<sup>23,32</sup> Taking into account the ever growing number of reports focused on angiogenesis as an additional target for improving surgical outcomes of glaucoma surgeries, new neovascularization

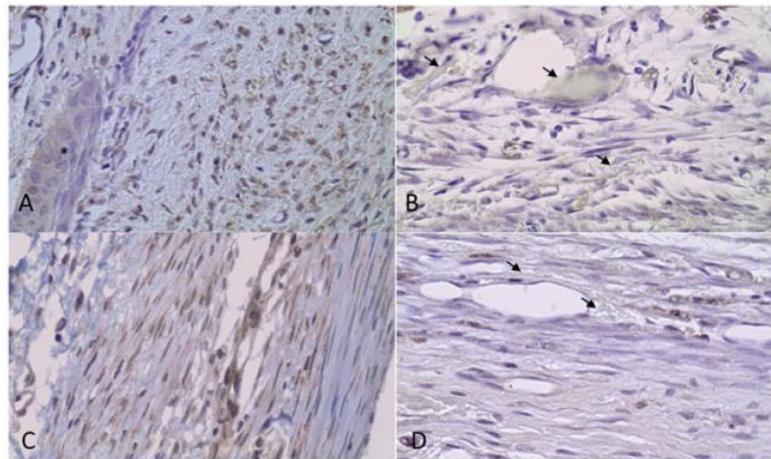


FIGURE 2 Immunohistochemical staining for VEGF in areas within surgical site centers. Note larger number of fibroblast and inflammatory cells stained in the control group (A) than RA group (B), on the fifth postoperative day. Conjunctival epithelium invagination is visible in (A), with very weak anti-VEGF staining (asterisk) and hyaline material is evident in (B), which was attributed to residuals from RA injections (arrows). Similar findings can be observed at 15th postoperative day in both control (C) and RA group (D), including the presence of hyaline material in (D). Magnification 400 $\times$ .

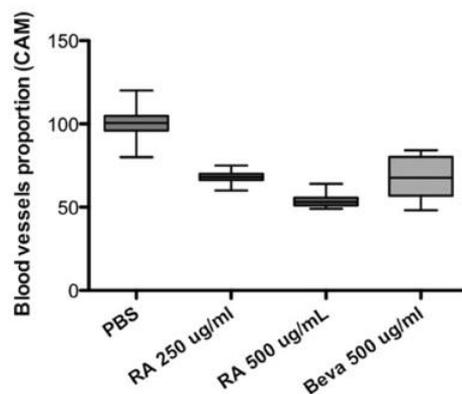


FIGURE 3 Proportion of blood vessels displayed as mean  $\pm$  standard error from CAM exposed to RA solutions (250 or 500  $\mu$ g/ml) and bevacizumab (beva, 500  $\mu$ g/ml). Phosphate buffered solution (PBS) was used as a control. In all treatment groups, declines in blood vessel proportion were significant relative to the control. Interestingly, 500  $\mu$ g/ml RA inhibited vessel formation more than 500  $\mu$ g/ml bevacizumab.

inhibitors should be evaluated, since current anti-fibrotic agents have shown frequent adverse effects.

RA is a herbal compound with several biological activities, including previous reports of its anti-fibrotic and anti-angiogenic effects.<sup>17,18</sup> In this study, we demonstrated anti-angiogenic effects of RA in both CAM assays and the histological analysis of

subconjunctival tissues at the filtration surgical site. In fact, RA produced a pronounced reduction in blood vessels of 45% in CAM and 55% at the surgical site. Since CAM analysis was performed objectively following the Image J protocol and a masked experienced ocular pathologist counted the number of blood vessels per field, these results provide strong evidence documenting anti-angiogenic effects of a RA solution at its working concentration. The anti-angiogenic effect of RA was greater than that of bevacizumab treatment, according to our CAM assays results. The CAM findings confirmed and validated RA effects since we postulated that bevacizumab treatment could serve as a positive control for vascularization inhibition.

Anti-VEGF staining was dramatically reduced in samples from the RA group, even after excluding from the analysis endothelial cells lining blood vessels' staining. Thus, the immunohistochemical analysis took only subconjunctival fibroblasts and inflammatory cells staining into account. The difference in this VEGF staining observed between groups may so reflect the importance of those cells in the angiogenic cascade activated by the healing process. Moreover, we also speculate that RA may act as a modulator of VEGF expression in such cells, inhibiting unknown points in the signaling cascade controlling VEGF secretion. Previous studies have shown RA is able to decrease proliferation and tube formation of endothelial cells, probably related to its suppression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced VEGF expression<sup>17</sup> or its anti-proliferative effect on vascular tissues, through cell cycle arrest at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases.<sup>38</sup>

6 J. L. M. Ferreira *et al.*

Our findings are based on an evident difference in vascularity scores of blebs, according to MBGS evaluation. However, no group differences were found between other clinical signs underlying good bleb functioning, including IOP, on the 15th day. We speculate RA could inhibit vascularization related to wound healing, but it was unable to control all steps related to the longer-term subconjunctival fibrosis. In fact, there are no indications of any histological differences in either extracellular matrix or inflammatory cells between the groups. Besides, clinical evaluation (including IOP) of experimental models of filtration surgery is limited because fibrosis usually occurs earlier and is more aggressive in these animal models than that observed in humans.<sup>39</sup>

Limitations of this study are related to the short period of clinical and histological evaluation, the necessity of subconjunctival injections to guarantee RA accessibility and no specific analysis of other fibrotic parameters, such as collagen deposition or myofibroblast differentiation. Furthermore, as described, only one masked researcher evaluated and graded the bleb appearance, which could lead to an observation bias. However, this researcher (J. L. M. F.) was extensively trained previously and has demonstrated low grading variability using that grading system.

Furthermore, the hyaline material observed in some histological slices is of unknown origin, but could represent residuals from RA injections. We experienced some difficulty in obtaining a homogeneously dispersed RA solution due to the high concentration used. It is possible that the high RA concentration could be transformed to a colloidal suspension in the subconjunctival space, which warrants further investigation. Based on our findings, a limited anti-angiogenic effect was observed on the 15th postoperative day, because in all analyses made, there were no significant declines except in the proportion of blood vessels/field. The larger declines and variability in results observed in several parameters of the control group at this time point (15th day) might account for why we could not resolve any other changes during our short-term study.

Despite these points highlighted and considering that RA has shown no toxic effect in the retinal pigment epithelium,<sup>18</sup> further *in vitro* and *in vivo* studies using RA are necessary to elucidate its mechanism of action. Furthermore, future clinical trials will be needed to verify its safety and efficacy in human glaucoma filtration surgery.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely acknowledge Adriana de Andrade Batista Murashima and Vani Maria Alves Correa of the Ribeirão Preto Medical School,

University of São Paulo, for their help in providing histological preparations and photographs for this study.

#### DECLARATION OF INTEREST

All the authors have no financial conflict of interest or personal commercial interest with this study.

Funding and financial support: FAPESP.

#### REFERENCES

1. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1268–1279.
2. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120:701–713.
3. Maier PC, Funk J, Schwarzer G, Antes G, Falck-Ytter YT. Treatment of ocular hypertension and open angle glaucoma: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2005;331:134.
4. AGIS investigators. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol* 2000;130:429–440.
5. Folgar FA, de Moraes CG, Prata TS, Teng CC, Tello C, Ritch R, Liebmann JM. Glaucoma surgery decreases the rates of localized and global visual field progression. *Am J Ophthalmol* 2010;149:258–264.
6. Skuta GL, Parrish 2nd RK. Wound healing in glaucoma filtering surgery. *Surv Ophthalmol* 1987;32:149–170.
7. Wong J, Wang N, Miller JW, Schuman JS. Modulation of human fibroblast activity by selected angiogenesis inhibitors. *Exp Eye Res* 1994;58:439–451.
8. Jonas JB, Spandau UH, Schlichtenbrede F. Intravitreal bevacizumab for filtering surgery. *Ophthalmic Res* 2007;39:121–122.
9. Jue A. Angiogenesis: trabeculectomy and bevacizumab. *Semin Ophthalmol* 2009;24:122–125.
10. Van Bergen T, Vandewalle E, Van de Veire S, Deweerchin M, Stassen J-M, Moons L, Stalmans I. The role of different VEGF isoforms in scar formation after glaucoma filtration surgery. *Exp Eye Res* 2011;93:689–699.
11. Chen CW, Huang HT, Bair JS, Lee CC. Trabeculectomy with simultaneous topical application of mitomycin-C in refractory glaucoma. *J Ocul Pharmacol* 1990;6:175–182.
12. Greenfield DS, Liebmann JM, Jee J, Ritch R. Late-onset bleb leaks after glaucoma filtering surgery. *Arch Ophthalmol* 1998;116:443–447.
13. Kitazawa Y, Taniguchi T, Nakano Y, Shirato S, Yamamoto T. 5-Fluorouracil for trabeculectomy in glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987;25:403–405.
14. De Fendi LI, Arruda GV, Scott IU, Paula JS. Mitomycin C versus 5-fluorouracil as an adjunctive treatment for trabeculectomy: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Experiment Ophthalmol* 2013;41:798–806.
15. Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, et al. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 2009;70:1663–1679.

## Rosmarinic Acid in Glaucoma Surgery 7

16. Jiang R, Lau K, Hon P, Mak TCW, Woo K. Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Curr Med Chem* 2005;12:237–246.
17. Huang S, Zheng R. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Lett* 2006;239:271–280.
18. Kim JH, Lee BJ, Kim JH, Yu YS, Kim MY, Kim K-W. Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21(WAF1) expression. *Eur J Pharmacol* 2009;615:150–154.
19. Cordeiro MF, Constable PH, Alexander RA, Bhattacharya SS, Khaw PT. Effect of varying the mitomycin-C treatment area in glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1639–1646.
20. Wells AP, Ashraff NN, Hall RC, Purdie G. Comparison of two clinical Bleb grading systems. *Ophthalmology* 2006;113:77–83.
21. Knoll A, Schmidt S, Chapman M, Wiley D, Bulgrin J, Blank J, Kirchner L. A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. *Microvasc Res* 1999;58:1–9.
22. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 1996;40:1189–1197.
23. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 2014;5:123.
24. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012;18:1028–1040.
25. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs – molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:746–756.
26. Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991;138:1257–1265.
27. MacDonald EM, Cohn RD. TGFβ signaling: its role in fibrosis formation and myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:628–634.
28. Cordeiro MF, Bhattacharya SS, Schultz GS, Khaw PT. TGF-β 1, -β 2, and -β 3 in vitro: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:756–763.
29. Staton CA, Reed MWR, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 2009;90:195–221.
30. O'Neill EC, Qin Q, Van Bergen NJ, Connell PP, Vasudevan S, Coote MA, et al. Antifibrotic activity of bevacizumab on human Tenon's fibroblasts in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6524–6532.
31. Zhang G-Y, Yi C-G, Li X, Zheng Y, Niu Z-G, Xia W, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor expression in keloid fibroblasts by vector-mediated vascular endothelial growth factor shRNA: a therapeutic potential strategy for keloid. *Arch Dermatol Res* 2008;300:177–184.
32. Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Upregulation of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor in cultured keloid fibroblasts: relevance to angiogenic activity. *Arch Dermatol Res* 2005;297:161–169.
33. Van Bergen T, Vandewalle E, Van de Veire S, Dewerchin M, Stassen J-M, Moons L, Stalmans I. The role of different VEGF isoforms in scar formation after glaucoma filtration surgery. *Exp Eye Res* 2011;93:689–699.
34. Li Z, Van Bergen T, Van de Veire S, Van de Vel I, Moreau H, Dewerchin M, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces scar formation after glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5217–5225.
35. Mathew R, Barton K. Anti-vascular endothelial growth factor therapy in glaucoma filtration surgery. *Am J Ophthalmol* 2011;152:10–15.
36. Paula JS, Ribeiro VRC, Chahud F, Cannellini R, Monteiro TC, Gomes ECDL, et al. Bevacizumab-loaded polyurethane subconjunctival implants: effects on experimental glaucoma filtration surgery. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013;29:566–573.
37. Grewal DS, Jain R, Kumar H, Grewal SPS. Evaluation of subconjunctival bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy a pilot study. *Ophthalmology* 2008;115:2141–2145.
38. Makino T, Ono T, Muso E, Yoshida H, Honda G, Sasayama S. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1140–1145.
39. Miller MH, Grierson I, Unger WI, Hitchings RA. Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalmic Surg* 1989;20:350–357.