

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL - EQUINOS**

***AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLORIDRATO DE ROPIVACAÍNA NO ENDOTÉLIO  
CORNEANO DE EQUINOS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
VARREDURA. ESTUDO IN VITRO***

MARCELE DE SOUZA MUCCILLO

PORTO ALEGRE 2018

EFEITOS DO CLORIDRATO DE ROPIVACAÍNA 0,75% NO ENDOTÉLIO  
CORNEANO DE EQUINOS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
VARREDURA: ESTUDO IN VITRO

EFFECTS OF ROPIVACAINE CHLORIDRATE ON CORNEAL ENDOTHELIUM OF  
HORSES USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY: IN VITRO STUDY

Autora: Marcele de Souza Muccillo

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção de grau de Doutora em Medicina Animal  
– Equinos.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

PORTO ALEGRE 2018

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

#### CIP - Catalogação na Publicação

Muccillo, Marcele de Souza  
Avaliação dos efeitos do cloridrato de ropivacaína  
no endotélio corneano de equinos utilizando a  
microscopia eletrônica de varredura: estudo in vitro /  
Marcele de Souza Muccillo. -- 2018.  
37 f.  
Orientador: João Antônio Tadeu Pigatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto  
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Anestesia intracamerar. 2. Ropivacaína. 3.  
Endotélio da córnea. 4. Equinos. 5. Microscopia  
eletrônica. I. Pigatto, João Antônio Tadeu, orient.  
II. Título.

Marcele de Souza Muccillo

EFEITOS DO CLORIDRATO DE ROPIVACAÍNA 0,75% NO ENDOTÉLIO  
CORNEANO DE EQUINOS UTILIZANDO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
VARREDURA. ESTUDO IN VITRO

Aprovada em:

Aprovada por:

---

Prof. Dr. João Antonio Tadeu Pigatto

Orientador e Presidente da banca

---

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

Membro da banca

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Pacheco de Araújo

Membro da banca

---

M.V. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Caldart de Andrade

Membro da banca

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha filha, Lavínia, que desde muito jovem já é uma apaixonada por cavalos, e responsável por dar um novo sentido a minha vida.

Agradeço a minha noiva Juliane, pela cumplicidade, amor, carinho e apoio nos momentos difíceis. Obrigada por ser esta mulher especial e nerd, que me aceita, me entende e faz a minha vida mais feliz a cada dia que passamos juntas.

Agradeço a minha irmã que mesmo morando longe se faz cada dia mais presente na minha vida. A minha mãe e avós maternos que infelizmente já partiram, mas que foram fundamentais para a construção do meu caráter, educação e pelo estímulo a prosseguir na profissão que tanto amo.

À Faculdade de Veterinária da UFRGS, minha casa desde 1997 quando entrei no curso de graduação, e onde tenho o privilégio de fazer parte como médica veterinária desde 2004. A todas e todos os meus colegas de trabalho pelo apoio, conselhos e momentos especiais que tornam o meu trabalho no Hospital Veterinário da UFRGS muito gratificante. Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, ao Hospital de Clínicas Veterinárias e todos os seus colaboradores, por propiciarem o ambiente de aprendizado e troca de experiências.

A todos os integrantes do Serviço de Oftalmologia do HCV, onde aprendo diariamente, em especial à bolsista Renata pelo apoio na análise das amostras. Um serviço que tenho orgulho de fazer parte há tantos anos.

Agradeço ao meu orientador professor Pigatto por me aceitar como sua orientada, depois da troca de orientador. Muito obrigada pelos conselhos, incentivos e por me transmitir apaixonadamente seus ensinamentos sobre a oftalmologia veterinária. A ti meu orientador, a minha eterna gratidão.

Marcela, Michelle e vocês foram fundamentais para eu chegar aqui, nossa viagem pra São Gabriel foi um momento único e inesquecível!

À médica veterinária Neide, apaixonada por sua profissão e um exemplo de profissional. À toda a equipe do abatedouro de equídeos Foresta, por disponibilizarem o material biológico para o desenvolvimento do experimento.

À técnica Denise, ao técnico Francis e ao Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS, pelos ensinamentos e pela paciência.

Foi uma jornada difícil até aqui, lutei para ser quem eu sou, e ganhei muitos amigas e amigos verdadeiros nesta jornada.

O apoio de todas e todos foi fundamental para a conclusão de mais esta etapa da minha vida. Meus sinceros e profundos agradecimentos a quem tornou este sonho uma realidade possível.

“It is revolutionary for any trans person to choose to be seen and visible in a world that tells us we should not exist”.

Laverne Cox

Ativista, atriz norte-americana e produtora de televisão

“It just means your future hasn't been written yet. No one's has. Your future is whatever you make it. So, make it a good one.”

Christopher Lloyd, as Doc Brown.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{m}^2$ : micrômetros quadrados

ARVO: Association for Research in Vision and Ophthalmology – Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia  
cél/mm<sup>2</sup>: células por milímetro quadrado

CMM: Centro de Microscopia e Microanálise

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

ISSN: International Standard Serial Number  
kV: quilovolt

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura  
mm: milímetros  
mm<sup>2</sup>: milímetros quadrados

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
 $\mu\text{m}$ : micrômetros

%: porcentagem

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO_____	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA_____	13
2.1	Endotélio da córnea_____	13
2.2	Métodos de avaliação endotelial_____	14
2.3	Anestesia local em oftalmologia _____	16
3.	OBJETIVOS_____	20
4.	ARTIGO CIENTÍFICO: Effects of ropivacaine chloridrate on corneal endothelium of horses using scanning electron microscopy: in vitro study _____	21
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS_____	31
6.	REFERÊNCIAS_____	32



## RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos agudos do cloridrato de ropivacaína no endotélio da córnea de equinos saudáveis. Vinte e seis córneas de 13 cavalos, machos ou fêmeas, de diferentes idades e provenientes de abatedouro comercial licenciado foram aleatoriamente divididas em três grupos compostos por 13 córneas cada. Grupo A: o endotélio da córnea foi exposto ao cloridrato de ropivacaína a 0,75% por 60 segundos, e o endotélio da córnea do grupo B foi exposto ao cloridrato de ropivacaína a 0,75% por 15 minutos. Grupo C: o endotélio da córnea foi exposto à solução salina balanceada por 60 segundos. Após todas as amostras foram lavadas com solução salina balanceada. As córneas então foram excisadas com trépano de 8mm e preparadas para avaliação com microscopia eletrônica de varredura. Foram obtidas eletromicrofias aleatórias de cada amostra. As imagens foram analisadas e com auxílio de um software as áreas com ausência de células endoteliais foram mensuradas. Foram descritas as somas das áreas em percentagem para cada tratamento (A, B e C) pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Foi avaliada a distribuição das variáveis pelo teste de Shapiro-Wilk que apontou distribuição não normal. Foi utilizado para a comparação da soma das áreas entre os tratamentos o teste de Friedman. O teste de Wilcoxon foi utilizado para detectar as diferenças e o seu valor de P foi corrigido pelo teste de Bonferroni, devido às comparações múltiplas realizadas. Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas. A média da perda endotelial, expressas em percentual em relação à área total, das amostras do grupo A foi 5,28%. A média da perda endotelial das amostras do grupo B, expressas em percentual em relação à área total, foi 20,39%. O dano no endotélio da córnea foi significativamente maior no grupo B comparativamente ao grupo A e C. Com base nos resultados apresentados foi possível concluir que o cloridrato de ropivacaína a 0,75% induziu dano agudo nas células do endotélio da córnea de equinos.

**Palavras-chave:** anestesia intracamerar, ropivacaína, endotélio da córnea, equinos.

## **ABSTRACT**

The aim of the study was to investigate the acute effects of ropivacaine chlorhydrate on the corneal endothelium of healthy equines. Twenty-six corneas from 13 horses, males and females, of different ages, acquired from a licensed commercial slaughterhouse were randomly divided into three groups (13 corneas each). Group A: the corneal endothelium was exposed to ropivacaine chlorhydrate at 0.70% during 60 seconds. Group B: the corneal endothelium was exposed to ropivacaine chlorhydrate at 0.75% during 15 minutes. Group C: the corneal endothelium was exposed to a balanced saline solution during 60 seconds. Each sample was washed with a balanced saline solution. Corneas were excised with an 8mm surgical drill bit and prepared for scanning electron microscopy. Electromicrographies were collected at random from each sample. Images were analyzed using a specific software and regions lacking endothelial cells were measured. Total of areas was described for each treatment (A, B and C) through percentage, mean, median, standard deviation, minimum and maximum. The distribution of variables was evaluated through the Shapiro-Wilk test, which unraveled a non-normal distribution. The Friedman test was applied in order to compare the sum of the areas between treatments. The Wilcoxon test was used to detect significant differences and, due to multiple comparisons, its p-value was corrected by Bonferroni post-hoc test. A significance level of 5% was considered significant for the set comparisons. The average endothelial loss of samples, expressed in percentage in relation to the total area, was 5.28% and 20.39% for groups A and B, respectively. The corneal endothelium damage was significantly higher in group B, when compared to both groups A and C. Based on the present results it is possible to infer that ropivacaine chlorhydrate at 0.75% induces acute damage in corneal endothelial cells of equines.

**Keywords:** intracameral anesthesia, ropivacaine, corneal endothelium, equine.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o censo do IBGE de 2017, o Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial, cerca de 4.218.986 de animais. Em uma avaliação retrospectiva sobre facoemulsificação em 41 equinos os autores compararam os resultados visuais levando em consideração a idade dos animais, o implante de lente intraocular e a severidade da uveíte. Os mesmos concluíram que nos animais portadores de uveíte crônica o resultado visual foi significativamente desfavorável após o procedimento cirúrgico. No entanto, a idade avançada no momento da cirurgia e o uso de lente intraocular não foram associados com prognóstico desfavorável (EDELDMANN et al., 2014). Em 2009, com a criação da International Equine Ophthalmology Consortium propiciou-se o aprofundamento e o compartilhamento de conhecimento entre clínicos e pesquisadores, ajudando a divulgar a importância crescente da especialidade (GILGER, 2017).

Dessa forma é possível afirmar a importância do desenvolvimento da oftalmologia veterinária na clínica de equinos e a pesquisa para o desenvolvimento de técnicas anestésicas nesta espécie em cirurgia oftalmológica tem grande importância por garantir cada vez mais segurança aos procedimentos e contribuir para a crescente importância da equinocultura na economia nacional e internacional (GILGER, 2017).

O uso de visco anestesia ou “trojan anestesia” e anestesia intracameral tem sido proposta como uma alternativa aos bloqueios tradicionais, e clinicamente mostrou-se adequado e cada da vez mais empregado, devido ao conforto analgésico durante e após procedimento (PARK et al., 2010; WANG, 2013). Em um estudo realizado comparando viscoanestesia e anestesia intracameral com lidocaína 1%, não houve diferença estatisticamente significativa entre pressão intraocular pós-operatória ou perda celular e turbidez do humor aquoso entre os dois grupos de estudo, apesar do edema de córnea no grupo com viscoanestesia ter ocorrido em maior frequência. Os autores concluíram que apesar do conforto os pacientes expostos a viscoanestesia podem ter um risco aumentado para descompensação de córnea pós-operatória. Mas devido às limitações do estudo, não foi possível determinar se as diferenças entre os dois grupos resultaram da proteção de componentes do viscoelástico ou do componente de lidocaína (VALIMAKI et al., 2009).

Num estudo realizado in vitro com fibroblastos foi demonstrado que a lidocaína 0,25% diminuiu a viabilidade celular e causou degradação do DNA nos fibroblastos murino 3T6, enquanto que ropivacaína 0,5% não causou qualquer efeito degenerativo

celular ou molecular. Com isso, foi possível estabelecer que in vitro a ropivacaína é menos tóxica do que a lidocaína e indicando a necessidade de estudos in vivo para avaliar os efeitos da ropivacaína versus a lidocaína em intracameral anestesia em cirurgia de catarata (PESCOSOLIDO et al., 2011).

O uso de adjuvantes que diminuam a toxicidade dos anestésicos locais também tem sido estudado. Em um estudo com um uso de adjuvante antioxidante (ferulato de sódio, composto empregado na medicina tradicional chinesa) foi demonstrado em felinos e in vitro, que este protegeu as células endoteliais da córnea humana de citotoxicidade induzida por lidocaína e atenuou a perda de células endoteliais da córnea e o espessamento da córnea central dos olhos de gato após injeção intracameral com lidocaína 2%. Os autores concluíram que o provável efeito antioxidante do ferulato de sódio reduziu as reações citotóxicas e inflamatórias da córnea durante a anestesia intracameral (GUOJIAN et al., 2018). Em outro estudo, Trivedi e colaboradores em 2003 empregaram viscoanestesia e adicionaram o ácido hialurônico à formulação de lidocaína (0.5%, 1.0%, ou 1.65%) em coelhos e devido aos efeitos antioxidantes e protetores não houve lesão endotelial, corroborando com um estudo mais recente realizado avaliando o epitélio corneal de coelhos in vitro (BUCOLO et al., 2018; TRIVEDI et., 2003).

A única forma de tratamento de catarata em equinos é a remoção da lente opacificada e atualmente o procedimento mais utilizado e que apresenta os melhores resultados é a facoemulsificação (COLITZ, 2011; BROOKS et al., 2014; TOWNSEND, 2017). O edema de córnea tem sido apontado como uma importante complicação pós-operatória da cirurgia de remoção da catarata tanto em humanos quanto em animais (EGGELING et al., 2000; NAKANO et al, 2009; EDELMANN et al., 2014). Neste sentido, cada vez mais tem crescido os estudos relacionados ao emprego de fármacos intraoculares e as suas repercussões endoteliais (TRIVEDI et al, 2003; GUTIÉRREZCARMONA et al., 2005; CHANG et al., 2006; PARK et al., 2010; WEN et al., 2015; LEE et al., 2016; JIANG et al., 2018). Ao se recorrer à literatura foi encontrado apenas um estudo avaliando a ropivacaína 0,75% intraocular (KHAZBAK et al, 2006). Objetivou-se avaliar os efeitos agudos do cloridrato de ropivacaína no endotélio da córnea de equinos saudáveis utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Endotélio da córnea

A córnea é um tecido altamente diferenciado que permite a refração e a transmissão da luz. Para tanto, é necessário que sua integridade e transparência sejam mantidas. Entre os fatores responsáveis pela manutenção da espessura e da transparência corneana incluem-se: ausência de vasos sanguíneos e de pigmentos, inervação superficial amielinizada, bem como a organização e o funcionamento regular das células epiteliais e endoteliais (WARING et al., 1982; DOUGHTY, 1989).

O endotélio da córnea é uma monocamada de células poligonais interligadas que compõe a superfície posterior da córnea (YEE et al., 1987; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2006; DELMONTE & KIM, 2011). A integridade e a atividade metabólica dessa camada são essenciais para a manutenção da transparência da córnea (WARING et al., 1982; TUFT & COSTER, 1990; JOYCE, 2003; JOYCE, 2012). As alterações nas células endoteliais podem ocorrer em função do envelhecimento, de doenças oculares e de fármacos ou procedimentos cirúrgicos intraoculares (WARING et al., 1982; TUFT & COSTER, 1990; ABIB, 2000). O endotélio é o responsável pela manutenção da desidratação da córnea, fator fundamental para a sua transparência.

O endotélio possui capacidade limitada de regeneração na maioria das espécies e a sua reposição ocorre normalmente pelo aumento no tamanho das células endoteliais adjacentes à área lesionada (ABIB & BARRETO, 2001). Na maioria das espécies, quando ocorre perda de células endoteliais, as células remanescentes se alargam e se espalham para cobrir a superfície posterior da córnea, o que acarreta decréscimo na densidade celular (COLIN & COLIN, 1998; YEE et al., 1987; TUFT & COSTER, 1990).

Quando a perda das células ultrapassa a capacidade de compensação pelas células remanescentes, tem-se como resultado edema de córnea que compromete a sua transparência, podendo ocasionar a perda da visão (ABIB & BARRETO, 2001). O intervalo de tempo entre óbito e da adequada visualização da córnea e estruturas é de seis horas em média, observado em estudos que avaliaram a preservação de córneas humanas para transplante (SIT et al., 2001; FARIAS, 2007), garantindo que a mesma se comporte como um tecido in vivo até este período.

A perda de células endoteliais devido à lesão e ou doença, trauma cirúrgico ou envelhecimento leva à substituição por aumento e migração de células endoteliais adjacentes, em vez de replicação. O número total de células é reduzido, levando ao surgimento de células endoteliais anormalmente grandes (polimegatismo) e de forma

anormal (pleomorfismo). As junções apertadas são mantidas entre as células durante essa migração, e após o fechamento da ferida, os locais de bomba de sódio / potássioadenosina trifosfato (Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> -ATPase) são aumentados, mantendo as funções eficazes de barreira e de bomba, na tentativa de que a densidade celular seja maior que a densidade crítica de 400 a 700 células /mm<sup>2</sup> que ainda são capazes de prover a desidratação da córnea mantendo-a livre de opacidade (CLODE et al., 2011). O avanço da idade não provocou aumento da espessura da córnea de equinos, comprovando que a funcionalidade do endotélio se manteve preservada (ANDREW et al., 2001).

## 2.2. Métodos de avaliação endotelial

Para a avaliação morfológica e morfométrica do endotélio corneano de humanos e de animais são empregados vários métodos incluindo, a microscopia especular, a microscopia confocal, a microscopia óptica e a microscopia eletrônica de varredura (GWIN et al., 1982; COLLIN & COLLIN, 1998; ABIB & BARRETO, 2001; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2006; FRANZEN et al., 2010; FAGANELO et al., 2016). Com estes métodos é possível analisar, principalmente, a estimativa da densidade endotelial, o tamanho e a forma de das células do endotélio, bem como estudar os efeitos de fármacos ou de procedimentos cirúrgicos sobre o endotélio (EGGELING et al., 2000; CAÇA et al., 2006; SCHELLINI et al., 2007; LEDBETTER et al., 2009; TERZARIOL et al., 2016; SEGARRA et al., 2018).

A microscopia especular é o método de avaliação mais comumente utilizado para obtenção de informações sobre a morfologia e a morfometria das células do endotélio da córnea, no pré e pós-operatório da cirurgia de catarata, nas ceratoplastias e no acompanhamento de doenças endoteliais (WARING et al., 1980; ABIB & BARRETO, 2001; SHENG & BULLIMORE, 2007). Essa técnica têm sido utilizada também em estudos relacionados à morfologia corneana (OJEDA et al., 2001), à toxicidade de fármacos intracamerulares (LIOU et al., 2004) e na avaliação do endotélio de diferentes espécies (PIGATTO et al., 2006, FRANZEN et al., 2010, ALBUQUERQUE et al., 2015; BERCHT et al., 2015). A microscopia especular pode ser realizada através da utilização de microscópios de contato e de microscópios de não contato. (LAING et al., 1976; ABIB & BARRETO, 2001).

Em humanos, a densidade endotelial no recém-nascido é de 3.500 a 4.000 células por mm<sup>2</sup> e no adulto diminui para 1.400 a 2.500 células por mm<sup>2</sup>. Observa-se que com o avanço da idade ocorre um decréscimo na densidade endotelial (ABIB &

BARRETO, 2001). Em contrapartida, a área celular média e a variação do tamanho aumentam (GWIN et al., 1982; ABIB, 2000). As córneas com densidade endotelial entre 400 a 700 células por mm<sup>2</sup> tem o seu funcionamento prejudicado e desenvolvem edema de córnea. Em outros animais, como os cães, gatos, coelhos, cavalos e macacos também foram observados os mesmos padrões de alterações endoteliais verificados em dos indivíduos humanos com o avanço da idade (PEIFER et al., 1981; GWIN et al., 1982; ANDREW et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006; FRANZEN, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2015; BERCHT et al., 2015). Num estudo onde foi analisada a morfologia endotelial de diferentes regiões da córnea de equinos empregando os corantes vitais foi possível concluir que não existe diferença significativa entre as regiões central e periférica da córnea de equinos saudáveis (FAGANELLO et al., 2016). Essa técnica com corantes vitais também tem sido empregada para análise do endotélio da córnea de cães (HÜNNING et al., 2018).

Silva e colaboradores (2018), empregando o vermelho de alizarina e a microscopia óptica, investigaram os efeitos da indocianina verde nas células do endotélio da córnea de equinos. Esses autores concluíram que a indocianina verde a 0,5% não causou dano agudo nas células do endotélio da córnea de equinos. A microscopia eletrônica de varredura tem sido amplamente utilizada em estudos relacionados à morfologia corneana, à toxicidade de fármacos intracamerulares, à eficácia de meios de preservação da córnea e na avaliação da ultraestrutura do endotélio de diferentes espécies (OJEDA et al., 2001; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005b; CAÇA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; SCHELLINI et al., 2007; PIGATTO et al., 2009; TAMAYO-ARANGO et al., 2009; TERZARIOL et al., 2016).

Com essa metodologia é possível avaliar a morfologia celular, as bordas das células e o padrão do mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989). Entre os parâmetros de avaliação do endotélio possíveis de serem estudados por esta técnica, encontram-se a área celular média, a densidade de células endoteliais, o coeficiente de variação da área celular média e a porcentagem de células hexagonais (GWIN et al., 1982; PIGATTO et al., 2004).

### 2.3. Anestesia local em oftalmologia

Em cães e gatos os bloqueios mais citados na literatura para cirurgias do globo ocular são o bloqueio peribulbar, o bloqueio retrobulbar, os bloqueios dos nervos oftálmico, lacrimal e zigomático. Esses bloqueios requerem destreza e preparo do anestesista, porém existe o risco, embora pequeno, de complicações como hemorragia retrobulbar, principalmente quando a abordagem é retrobulbar (KLAUMANN & OTERO, 2013). Em abordagens retrobulbares há a possibilidade de perfuração do globo ocular, amaurose contralateral e anestesia do tronco cerebral e coma (OLIVER, et al., 2013; SHILO-BENJAMINI, 2019).

A lidocaína é um anestésico local do tipo amida, é o anestésico mais utilizado em bloqueios e na administração intracamerar (LIOU et al., 2004; BORAZAN, et al., 2009; FERNANDES et al., 2013; GUAY et al., 2015; LEE et al 2016). Seu efeito também é obtido por inibição reversível dos canais de sódio, sua lipossolubilidade é da ordem de 3,6 e seu tempo de ação médio é de 12 minutos. Em concentrações de 1, 2 e 4%, apresentando efeito dose dependente, promove a inibição de crescimento bacteriano, ao contrário da ropivacaína que não há evidências desta característica (KLAUMANN & OTERO, 2013).

A anestesia tópica com proparacaína 0,5% e tetracaína 0,5% a 1%, promove insensibilização rápida e o tempo de duração da analgesia dura em torno de 15 minutos (KLAUMANN & OTERO, 2013). Num estudo realizado em humanos, utilizando-se a anestesia intracamerar com lidocaína 2% em procedimentos de facoemulsificação, foram avaliados 106 pacientes (73,6% do sexo feminino), com idade média de 65,9 anos, não houve relato de qualquer dor transoperatória em 68,9% dos casos, e 98,10% dos pacientes negaram dor pósoperatória, além da ausência de intercorrências trans e pós-operatórias (FERNANDES et al., 2013).

O emprego de anestesia intracamerar com lidocaína é frequentemente utilizada, pois somente a anestesia tópica sobre a córnea muitas vezes é insuficiente. Isto se deve porque o nervo trigêmeo termina na córnea e na conjuntiva. A administração intracamerar é necessária para evitar a irritação dos nervos ciliares durante a manipulação ocular. E outro fator importante para a indicação desta técnica é que o anestésico local intracamerar favorece a midríase (GUTARRA et al., 2011; AMORIM et al., 2018).

Em outro estudo em humanos associando a anestesia tópica com injeção de lidocaína 2% na câmara anterior para facectomia por facoemulsificação realizada sob sedação consciente, concluiu-se que a técnica promoveu analgesia importante e com segurança (FERNANDES et al., 2013), porém neste estudo não houve avaliação do



dano endotelial, apenas o grau de satisfação dos pacientes submetidos a esta modalidade anestésica.

Embora em alguns estudos o emprego da anestesia intracameral tenha se mostrado seguro sem significativa alteração na pressão intraocular, espessura da córnea, densidade de células endoteliais ou características morfológicas (GERDING et al, 2004, FERNANDES et al., 2013; GUAY et al., 2015; LEE et al., 2016) quando comparado com outras técnicas anestésicas, vale ressaltar que na prática clínica, e em humanos, o anestésico mais empregado seria a lidocaína 1% que apresenta menos toxicidade comparada a outros anestésicos e concentrações. (LIOU et al., 2004; BORAZAN et al., 2009; LEE et al., 2016).

Diversos fatores intraoperatórios na facoemulsificação, como o tempo de ultrassom, o calor gerado na incisão e a anestesia intracameral podem induzir danos na integridade do endotélio resultando em edema e subsequente opacidade corneana muitas vezes irreversíveis (BORAZAN et al., 2009; VALIMAKI et al., 2009; GUAY et al, 2015; COLITZ et al., 2011).

Além dos fatores mecânicos decorrentes da técnica cirúrgica, os anestésicos locais podem causar lesão endotelial como citado em um experimento que se empregou lidocaína 2%, ropivacaína 1% e bupivacaína 0,75%, administrados por via intraocular em coelhos. Os autores observaram a ocorrência de alterações morfológicas das células em um curto período, além da diminuição da contagem endotelial corneana e aumento da taxa de apoptose, porém houve recuperação em sete dias (BORAZAN et al., 2009). No entanto, em coelhos a reparação endotelial ocorre não somente por hipertrofia celular, mas também por mitose durante toda vida, sendo das espécies estudadas a que apresenta maior capacidade de regeneração endotelial (HIRSCH et al., 1975), sendo necessários estudos avaliando a toxicidade em outras espécies ao que se refere ao dano celular causado pelos fármacos.

A concentração e o tempo de exposição também têm influência no grau das lesões endoteliais da córnea. Como corrobora o estudo realizado em culturas de células endoteliais de coelhos, com diferentes anestésicos, concentrações e tempos de exposição, concluiu-se que quanto maior a concentração de lidocaína, mais severas foram as alterações morfológicas e quanto maior o tempo de exposição, maiores foram as perdas de células endoteliais da córnea (CHANG et al., 2006). Em outro estudo, administrando-se lidocaína a 1% intracameral, não foram observadas modificações significativas no endotélio da córnea de coelhos (LIOU et al., 2004).

Com emprego da proparacaína foram observados efeitos deletérios no potencial transmembrana mitocondrial (MTP) das células do endotélio da córnea humana in vitro além de efeitos de ativação nas caspase-3, -8 e -9. Neste estudo, observou-se também que a proparacaína tem uma citotoxicidade notável tanto para as células humanas in vitro como para as células endoteliais de felino in vivo. Estes achados proporcionam novos rumos sobre a citotoxicidade e o efeito indutor de apoptose dos anestésicos locais, os quais devem ser usados com grande cautela na clínica oftalmológica (WEN et al., 2015).

A irrigação intracamerar com soluções frias, embora questionável, tem sido reportada como segura e uma alternativa ao uso de anestésicos locais para promover analgesia. Além disso, foi observada recuperação mais rápida do edema corneano em pacientes submetidos à irrigação com soluções geladas durante a facoemulsificação (GUTIÉRREZ-CARMONA & ÁLVAREZ-MARIN, 2005; ZHANG et al., 2009; TORRESMORENO, 2009). Em 2013, Biaggi avaliou a segurança e as vantagens da crioanestesia em cirurgia de catarata concluindo que não houve diferença no controle da intensidade da dor durante procedimento de facoemulsificação com o uso de anestesia tópica e solução de irrigação ocular em temperatura ambiente. Este mesmo autor observou também que não houve diferenças estatísticas entre variáveis específicas estudadas, como contagem celular endotelial, espessura corneana, ganho de visão, tempo de cirurgia, volume de irrigação, tempo de ultrassom e poder de ultrassom com o uso das diferentes técnicas anestésicas testadas nos grupos, concluindo que as vantagens da crio anestesia ainda permanecem questionáveis. Porém seu uso e associação com anestesia local para minimizar o dano endotelial ainda não foram testados.

A ropivacaína é um anestésico local, do tipo amida, de longa duração e seu efeito se dá por uma inibição reversível do influxo dos íons sódio nas fibras nervosas. Apresenta um alto grau de diferenciação motor sensorial, que pode ser útil quando o bloqueio motor é indesejável (KUTHIALA & CHAUDHARY, 2011). A ropivacaína tem um centro quiral que é o S-(-)-enantiômero puro. Quanto à osmolaridade, em um estudo, o endotélio corneano de humanos e coelhos foi perfundido com solução salina balanceada em diferentes osmolaridades, e observaram que o endotélio corneano pode tolerar soluções com osmolaridade de 200 a 400 mOsm/L sem ruptura celular, desde que íons essenciais estejam presentes (EDELHAUSER, 1981), A ropivacaína possuindo pKa de 8,1 e razão de distribuição de 141 (25°C noctanol/tampão fosfato pH 7,4), e 274.4 g/mol se mostra na faixa de osmolaridade tolerável pelo endotélio da córnea. Além disso, a curta duração da a lidocaína necessita administração repetida de doses,

especialmente durante a cirurgia de catarata, com isso a ropivacaína apresenta uma alternativa válida à bupivacaína tradicional e à lidocaína. Em um estudo comparando a ropivacaína 0,75% e a bupivacaína 0,5%, em um bloqueio oftálmico, a ropivacaína apresentou vantagens como longa duração de ação e efeito vasoconstritivo. A ropivacaína foi tão eficaz na anestesia durante a cirurgia de catarata quanto a bupivacaína. Foi possível concluir que ambos os agentes anestésicos são equivalentes na sua eficácia e apresentam a vantagem de ter uma melhor margem de segurança e menor toxicidade do que outros agentes anestésicos locais comparáveis (KASHYAP et al., 2018).

### **3. OBJETIVOS**

Com o presente estudo pretendeu-se avaliar os efeitos do cloridrato de ropivacaína 0,75% sobre a ultraestrutura do endotélio da córnea de equinos utilizando a microscopia eletrônica de varredura para identificar e quantificar as lesões endoteliais, valendo-se de análise morfométrica e verificar se existe diferença significativa no dano das células do endotélio da córnea de equinos com diferentes tempos de exposição.

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista *Veterinary Ophthalmology* (ISSN 1463-5224) e será traduzido para o inglês ao ser submetido.

Efeitos do cloridrato de ropivacaína 0,75% no endotélio da córnea de equinos  
utilizando microscopia eletrônica de varredura: estudo in vitro

M.S. Muccillo\*, M. Torikachvili\*, M.B. Petersen\* R.L. Baptista\*, J. A. T. Pigatto\*

\* Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

## **Efeitos do cloridrato de ropivacaína 0,75% no endotélio da córnea de equinos utilizando microscopia eletrônica de varredura: estudo in vitro**

M.S. Muccillo\*, M. Torikachvili\*, M.B. Petersen\* R.L. Baptista\*, J. A. T. Pigatto\*

\* Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

### **Resumo**

Objetivou-se avaliar os efeitos agudos do cloridrato de ropivacaína no endotélio da córnea de equinos saudáveis. Vinte e seis córneas de 13 cavalos, machos ou fêmeas, de diferentes idades e provenientes de abatedouro comercial licenciado foram aleatoriamente divididas em três grupos compostos por 13 córneas cada. Grupo A: o endotélio da córnea foi exposto ao cloridrato de ropivacaína a 0,75% por 60 segundos, e o endotélio da córnea do grupo B foi exposto ao cloridrato de ropivacaína a 0,75% por 15 minutos. Grupo C: o endotélio da córnea foi exposto à solução salina balanceada por 60 segundos. Após todas as amostras foram lavadas com solução salina balanceada. As córneas então foram excisadas com trépano de 8mm e preparadas para avaliação com microscopia eletrônica de varredura. Foram obtidas eletromicrofias aleatórias de cada amostra. As imagens foram analisadas e com auxílio de um software áreas com ausência de células endoteliais foram mensuradas. Foram descritas as somas das áreas em percentagem para cada tratamento (A, B e C) pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Foi avaliada a distribuição das variáveis pelo teste de Shapiro-Wilk que apontou distribuição não normal. Foi utilizado para a comparação da soma das áreas entre os tratamentos o teste de Friedman. O teste de Wilcoxon foi utilizado para detectar as diferenças e o seu valor de P foi corrigido pelo teste de Bonferroni, devido às comparações múltiplas realizadas. Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas. A média da perda endotelial, expressas em percentual em relação à área total, das amostras do grupo A foi 5,28%. A média da perda endotelial das amostras do grupo B, expressas em percentual em relação à área total, foi 20,39%. O dano no endotélio da córnea foi significativamente maior no grupo B comparativamente ao grupo A e C. Com base nos resultados apresentados foi possível concluir que o cloridrato de ropivacaína a 0,75% induziu dano agudo nas células do endotélio da córnea de equinos.

Palavras-chave: anestesia intracameral, ropivacaína, endotélio da córnea, equinos.

### **Introdução**

O uso de visco anestesia ou “trojan anestesia” e anestesia intracameral tem se tornado frequente como alternativa aos bloqueios tradicionais pela facilidade de ser empregado e pelo conforto analgésico durante e após o procedimento (PARK et al., 2010; WANG, 2013). No entanto, em um estudo comparando viscoanestesia e anestesia intracameral com lidocaína 1%, não houve diferença estatisticamente significativa entre pressão intraocular pós-operatórias, perda celular e turbidez do humor aquoso entre os dois grupos de estudo, apesar do o edema no grupo com viscoanestesia ter ocorrido

em maior frequência. Os autores que apesar do conforto, os pacientes expostos a viscoanestesia podem ter uma maior predisposição ao edema de córnea pós-operatório. No entanto, devido às limitações do estudo, não foi possível determinar se as diferenças entre os dois grupos resultaram da proteção de componentes do viscoelástico ou do componente de lidocaína (VALIMAKI et al., 2009).

Num estudo in vitro com fibroblastos (células precursoras endoteliais) foi possível observar que a lidocaína 0,25% diminuiu a viabilidade celular e causou degradação do DNA nos fibroblastos murino 3T6, enquanto que ropivacaína 0,5% não causou qualquer efeito degenerativo celular ou molecular. Os autores concluíram que in vitro a ropivacaína é menos tóxica do que a lidocaína a estas células e indicando a necessidade de estudos in vivo para avaliar os efeitos da ropivacaína versus a lidocaína em anestesia intracameral em cirurgia de catarata (PESCOSOLIDO et al., 2011).

O efeito citotóxico dos anestésicos locais tem sido recentemente estudado em diversas linhagens celulares normais e tumorais (TIAN et al., 2016; KANG, et al., 2016). Com emprego da proparacaína foram observados efeitos deletérios no potencial transmembrana mitocondrial (MTP) das células do endotélio da córnea humana in vitro além de efeitos de ativação nas caspase-3, -8 e -9. Neste estudo, observou-se também que a proparacaína tem uma citotoxicidade notável tanto para as células humanas in vitro como para as células endoteliais de felino in vivo (WEN et al., 2015).

Estes achados proporcionam novos rumos sobre a citotoxicidade e o efeito indutor de apoptose dos anestésicos locais, que indicam que a toxicidade depende do agente, concentração e tempo de exposição (LIOU et al., 2004; CAÇA et al, 2006; CHANG et al., 2006; BORAZAN, 2009) e há uma tendência que a viabilidade celular não seja afetada pela acidez dos anestésicos (KANG, 2016). Em razão destes fatos, o uso intracameral de anestésicos locais deve ser visto com grande cautela, principalmente na espécie equina onde há carência de estudos sobre os possíveis efeitos citotóxicos dos anestésicos locais sob o endotélio da córnea.

Com o presente estudo objetivou-se avaliar os efeitos agudos do cloridrato de ropivacaína no endotélio da córnea de equinos saudáveis.

## **Material e métodos**

Foram estudadas 26 córneas de 13 equinos (*Equus ferus caballus*), machos ou fêmeas, com diferentes idades provenientes do Frigorífico Foresta Ltda, São Gabriel, RS, Brasil. Os animais foram abatidos em matadouro frigorífico, com Serviço de

Inspeção Federal de acordo com os preceitos técnicos e humanitários vigentes na legislação específica. O experimento foi realizado de acordo com as normas da Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) e aprovado pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Imediatamente após o abate todos os olhos foram submetidos à prova da fluoresceína (Fluoresceína sódica 1%, Allergan®). Os bulbos oculares que apresentaram evidência de doença ocular foram excluídos. Imediatamente após o exame ocular foi realizada enucleação e os bulbos oculares mantidos em câmara úmida até a coleta das córneas. Os botões corneoesclerais foram removidos com bisturi e tesoura e as córneas então excisadas com trépano de 8 mm de diâmetro, sendo 3 amostras de cada animal (olho direito: grupo controle e olhos esquerdos 2 amostras centrais das córneas).

As amostras foram distribuídas aleatoriamente em três grupos compostos por 26 bulbos oculares cada. O grupo C foi o grupo controle e composto pelas córneas dos bulbos oculares esquerdos. Os grupos A e B foram os grupos tratamentos e formado pelas córneas dos bulbos oculares direitos. Nas córneas do grupo C instilou-se 0,5ml de solução salina balanceada (Halex Istar®, solução oftálmica, Goiânia, GO) durante 15 minutos. As córneas do grupo A foram expostas ao cloridrato de ropivacaína 0,75%, por um minuto e após foi realizada a irrigação com solução salina balanceada. As córneas do grupo B foram expostas ao cloridrato de ropivacaína 0,75% durante 15 minutos, e após foram irrigadas com solução salina balanceada.

Posteriormente, todas as amostras foram mantidas em glutaraldeído a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pH 7,4. O preparo e a análise das córneas foram realizados junto ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS. As amostras foram removidas da solução de glutaraldeído, lavadas em solução tampão de cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações ascendentes de acetona (30, 50, 70, 80, 90 por 10min em cada uma das concentrações e por 20 min a 90% novamente). Após as amostras ficaram 30 min em acetona 100% e foram submetidas à secagem em ponto crítico com dióxido de carbono líquido. As amostras foram fixadas em stubs com fita adesiva e metalizadas com ouro-paládio. As superfícies endoteliais posteriores foram examinadas com microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL, Tokyo, Japan) operando a 15 kV. De cada amostra foram obtidas cinco eletromicrografias com aumentos de 950x. Ocasionalmente, foram obtidas imagens com aumento de 30x para ter uma visão panorâmica de cada amostra. A área celular total das eletromicrografias, bem como a delimitação da área desprovida de endotélio foi obtida empregando-se o software ImageJ® (ImageJ 1.51k). As áreas desprovidas de células endoteliais foram calculadas. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo examinador.



Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 20.0 para análise estatística. Foram descritas as somas das áreas para cada tratamento (A, B e C) expressas em percentual em relação à área total pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Foi avaliada a distribuição das variáveis pelo teste de Shapiro-Wilk que apontou distribuição não normal. Foi utilizado para a comparação da soma das áreas expressas em percentual do total entre os tratamentos o teste de Friedman. O teste de Wilcoxon foi utilizado para detectar as diferenças e o seu valor de P foi corrigido pelo teste de Bonferroni, devido às comparações múltiplas realizadas. Foi considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas.

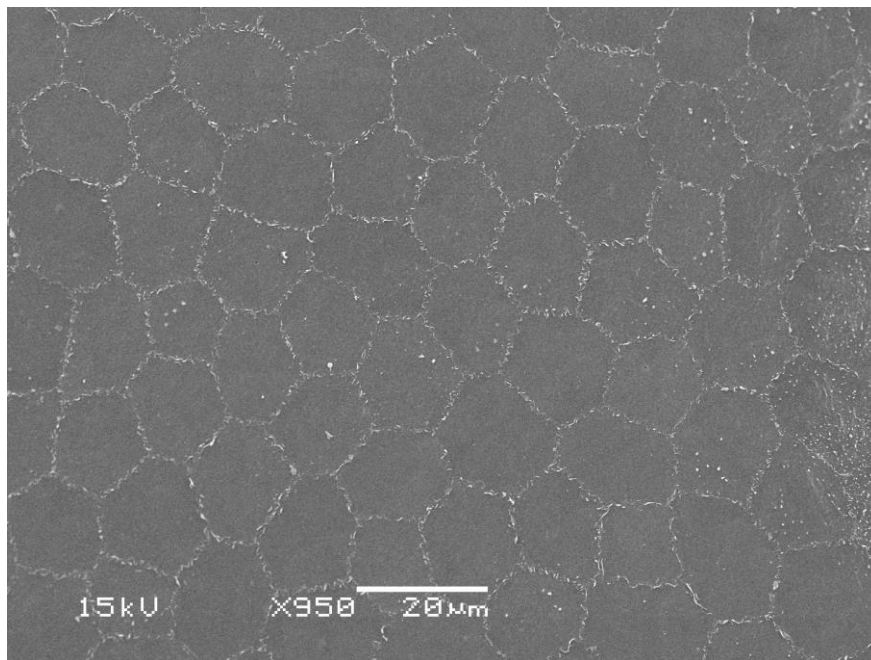
## **Resultados**

Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível observar, analisar e obter imagens do endotélio da córnea em todas as amostras analisadas. Nas amostras do grupo controle não foram observadas áreas com dano endotelial e o padrão regular das células endoteliais foi observado em todas as amostras (Figura 1). Foram observadas perdas endoteliais tanto nas amostras do grupo A, quanto nas amostras do grupo B (Figuras 2 e 3). A média da perda endotelial, expressa em percentual em relação à área total, das amostras do grupo A foi 5,28%. A média da perda endotelial das amostras do grupo B, expressas em percentual em relação à área total, foi 20,39%. Foram coletados os dados de 13 animais nas condições A, B e C, e a soma das áreas expressas em percentual do total foram descritas na Tabela 1. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos A, B e C ( $P < 0,001$ ). Os valores encontrados na soma das áreas expressas em percentual são mais altos no B quando comparado com o A ( $P = 0,006$ ) e comparado com o C ( $P = 0,003$ ). Houve diferença significativa também entre os valores encontrados no A em relação ao C ( $P = 0,005$ ). Na Figura 4 encontra-se a representação gráfica da Tabela 1.

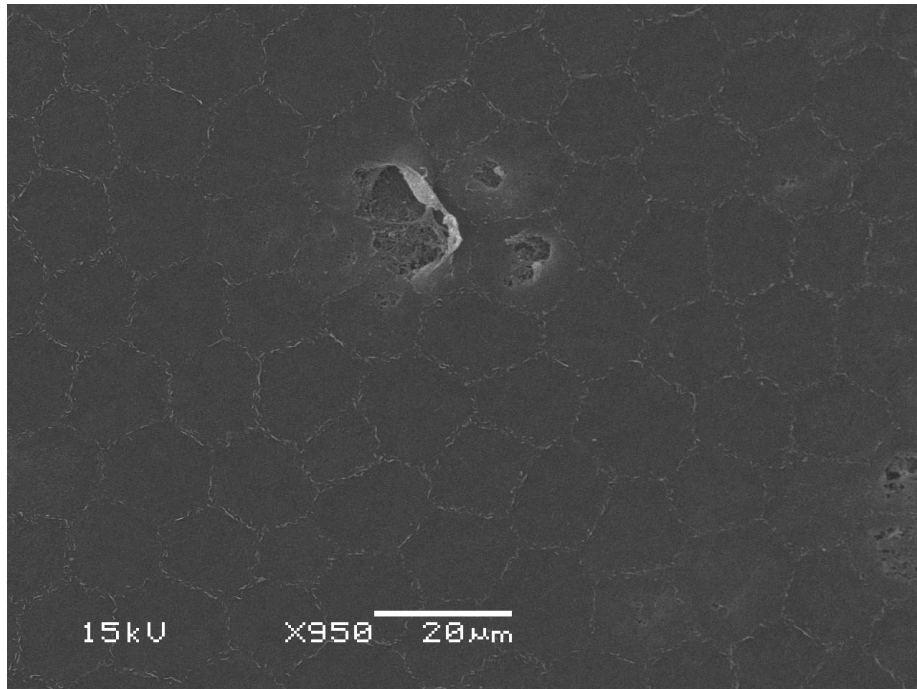
**Tabela 1.-** Tabela descritiva e comparativa da somas das áreas das perdas endoteliais, expressas em percentual, do endotélio da córnea de equino dos grupos A, B e C. Comparação pelo teste de Friedman ( $P < 0,001$ )

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Média	5,28	20,39	0
Mediana	2,93	19,04	0
Desvio padrão	5,49	10,46	0
Mínimo	0,00	3,44	0
Máximo	16,69	38,79	0

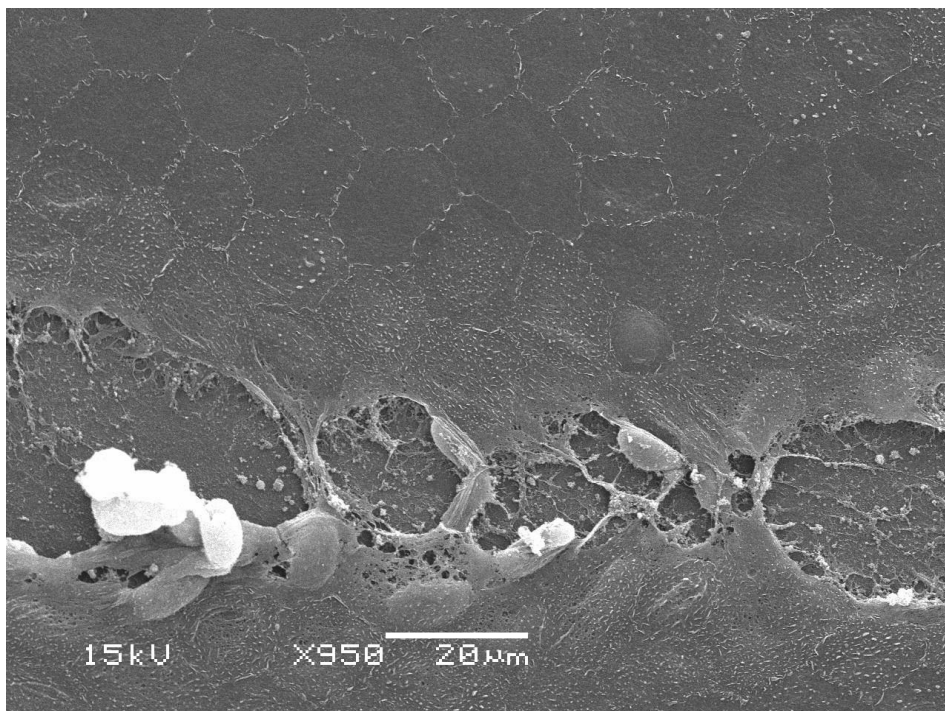
Comparação pelo teste de Friedman ( $P < 0,001$ )



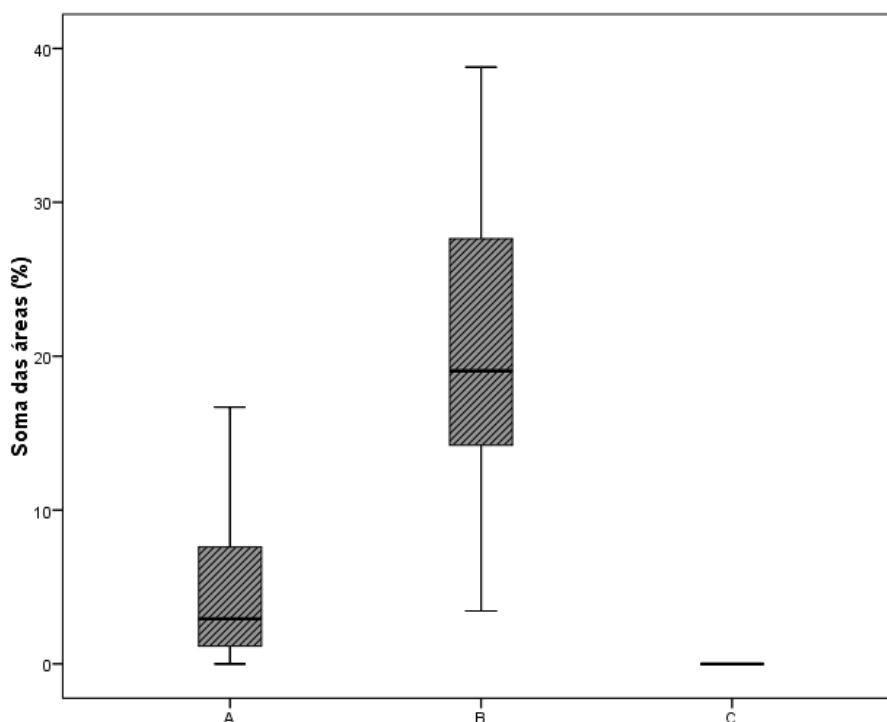
**Figura 1.** Eletromicrografia de varredura do endotélio da córnea de equino do grupo controle. Observam-se células poligonais e padrão regular do endotélio da córnea e ausência de dano endotelial. Aumento original de 950 X; Barra = 20 µm.



**Figura 2.** Eletromicrografia de varredura do endotélio da córnea de equino do grupo A. Observam-se células poligonais e área de perda celular de 1,78%. Aumento original de 950 X; Barra = 20 µm.



**Figura 3.** Eletromicrografia de varredura do endotélio da córnea de equino do grupo A. Observam-se células poligonais e área de perda celular de 17,97%. Aumento original de 950 X; Barra = 20 µm.



**Figura 4.** Dados em “boxplot” referentes a soma das áreas das perdas celulares, expressas em percentual, do endotélio da córnea de equino dos grupos A, B e C.

## Discussão e conclusão

Com relação à anestesia intracameral em humanos e em outras espécies de animais foram realizados estudos avaliando a toxicidade endotelial e o conforto dos pacientes (TAN & BURTON, 2000; BORAZAN et al., 2009; PARK et al., 2010; GUAY et al., 2015;). No entanto, no que diz respeito à espécie equina e aos anestésicos intracamerais existe uma carência de pesquisas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essa evidência e a importância do tema auxiliaram na motivação para realização do presente estudo. Optou-se pelo uso de bulbos oculares de equinos provenientes de abatedouro por questões éticas e econômicas. O estudo realizado *in vitro* fez com que não fossem sacrificados animais somente para este fim. Além disso, estudos prévios realizados em olhos de animais admitiram que em até seis horas após a morte o endotélio pode ser analisado sem que ocorram alterações estruturais nessa camada (SIT et al., 2001; FARIAS, 2007; PIGATTO et al., 2008; FRANZEN et al., 2010; FAGANELLO et al., 2016).

As técnicas *in vitro* para a análise endotelial tem se mostrado cada vez mais uma alternativa ao emprego de animais vivos para avaliação da toxicidade de fármacos intraoculares na córnea (PESCOSOLIDO et al., 2011; TERZARIOL et al., 2016; WEN et al., 2015; SILVA et al., 2018; JIANG et al., 2018). No presente estudo, optou-se por manter a ropivacaína e contato direto com o endotélio da córnea com o intuito de verificar se a

mesma induziria dano endotelial. Em estudos prévios esta metodologia já foi empregada com bons resultados (KHAZBAK et al., 2006; CAÇA et al., 2006; PESCOSOLIDO et al., 2011; WEN et al., 2015; TERZARIOL et al., 2016; SILVA et al., 2018). Em outros estudos porém foi realizada a injeção intracameral da substância testada (BORAZAN et al., 2009). Com isso, a diluição da substância no humor aquoso poderia minimizar seus efeitos tóxicos no endotélio. Por esse motivo e pelo fato de ser um fármaco que nunca fora testado em equinos, optou-se pela trepanação da córnea e exposição direta do anestésico com o endotélio.

No presente estudo, a metodologia empregada mostrou-se viável permitindo a obtenção de imagens, a análise e a quantificação das perdas celulares endoteliais. Na espécie equina o procedimento cirúrgico para remoção da catarata tem sido amplamente executado (EDELHANN et al., 2014; Brooks et al., 2014; TOWNSEND, 2017). A importância da escolha de técnicas e fármacos com menor toxicidade é imprescindível em decorrência de múltiplos fatores intraoperatórios da cirurgia de facoemulsificação, como o tempo de ultrassom, o calor gerado na incisão, a anestesia intracameral e outros fármacos podem induzir danos na integridade do endotélio resultando em edema e subsequente opacidade corneana muitas vezes irreversíveis (KHAZBAK et al., 2006; BORAZAN et al., 2009; VALIMAKI, et al., 2009; GUAY et al., 2015; NAUTSCHER, et al., 2015; LEE et al., 2016).

A ropivacaína é um anestésico local, do tipo amida, de longa duração e seu efeito se dá por uma inibição reversível do influxo dos íons sódio nas fibras nervosas. Apresenta um alto grau de diferenciação motor sensorial, que pode ser útil quando o bloqueio motor é indesejável (KUTHIALA et al., 2011). A ropivacaína tem um centro quiral que é o S-(-)enantiômero puro. A ropivacaína possui pKa de 8,1 e razão de distribuição de 141 (25oC noctanol/tampão fosfato pH 7,4), 274.4 g/mol e não contém conservantes na sua formulação disponível. Este fármaco nesta concentração é amplamente empregado na realização de bloqueios em oftalmologia por promover analgesia em alguns pacientes por até 12 horas, sendo superior à lidocaína (KUTHIALA et al., 2011). A ropivacaína 1% quando comparada a lidocaína 2% se mostra mais efetiva em promover analgesia, e não promove perda da densidade endotelial significativa em humanos (MARTINI et al., 2002; IACOBELLI et al., 2005).

Em concentrações de 0,1% a 0,5% já foi demonstrada em alguns estudos a sua segurança e analgesia em um estudo utilizando-se concentração de 0,2%, porém em concentrações de 1% a ropivacaína induziu lesões no endotélio corneano de outras espécies (SOKER et al., 2004; CAÇA et al., 2006; BORAZAN et al., 2009; PESCOSOLIDO

et al., 2011; KLAMT, 2003). Em apenas um estudo a ropivacaína 0,75% foi empregada e demonstrou toxicidade no endotélio da córnea em coelhos (KHAZBAK et al., 2006).

Das técnicas empregadas para a comprovação da toxicidade de fármacos no endotélio da córnea destacam-se a microscopia óptica associada ao vermelho de alizarina e a microscopia eletrônica de varredura (EGGELING et al., 2000; TRIVEDI et al., 2003; CAÇA et al., 2006; SCHELLINI et al., 2007; LEDBETTER et al., 2009; SEGARRA et al., 2018; SILVA et al., 2018;). O emprego da microscopia óptica após a coloração do endotélio com corantes vitais tem se mostrado uma forma simples, rápida e prática para detectar danos celulares bem como para analisar o formato das células endoteliais (FAGANELLO et al., 2016).

No presente estudo, fez-se a opção pela microscopia eletrônica de varredura por esta já ter sido amplamente utilizada em estudos relacionados à morfologia corneana, à toxicidade de fármacos intracamerais, à eficácia de meios de preservação da córnea e na avaliação da ultraestrutura do endotélio de diferentes espécies (OJEDA et al., 2001; PIGATTO et al., 2004; PIGATTO et al., 2005a; PIGATTO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; PIGATTO et al., 2009; TAMAYO-ARANGO et al., 2009; TERZARIOL et al., 2016). A vantagem desta técnica está na facilidade da avaliação da morfologia e das bordas celulares, além do padrão mosaico endotelial (DOUGHTY, 1989). Entre os parâmetros de avaliação do endotélio, possíveis de serem estudados por esta técnica, encontram-se a área celular média, a densidade de células endoteliais, o coeficiente de variação da área celular média e a porcentagem de células hexagonais (GWIN et al., 1982; PIGATTO et al., 2004).

Neste experimento foi possível visualizar efeitos tóxicos agudos causados pela exposição direta do cloridrato de ropivacaína tanto nas amostras expostas durante 1 minuto, quanto nas amostras expostas durante 15 minutos. O percentual de dano celular e foi mais elevado nas amostras provenientes do grupo B. No entanto, quando comparado com o grupo controle a ropivacaína induziu danos celulares significativos e grandes áreas com exposição da membrana de Descemet foram observadas.

Lesões semelhantes no endotélio da córnea já foram documentadas em outros estudos empregando-se anestésicos locais (TAN & BURTON, 2000; EGGELING et al. 2000; KHAZBAK et al., 2006; TIAN, et al., 2016). Embora em alguns estudos o emprego da anestesia intracameral tenha se mostrado seguro sem significativa alteração na pressão intraocular, espessura da córnea, densidade de células endoteliais ou características morfológicas (GERDING et al, 2004, FERNANDES et al., 2013; GUAY et al., 2015; LEE et al., 2016) quando comparado com outras técnicas anestésicas, vale

ressaltar que na prática clínica, e em humanos, o anestésico mais empregado seria a lidocaína 1% que apresenta menos toxicidade comparada a outros anestésicos e concentrações. (LIOU et al., 2004; BORAZAN et al., 2009; LEE et al., 2016).

Outro ponto a ser considerado é a possibilidade da presença de radicais livres, mesmo em preparações livres de conservantes, que poderiam atuar sinergicamente no aumento do dano endotelial (LOCKINGTON et al., 2010). Uma tendência atual é o emprego de fármacos adjuvantes para minimizar o dano dos anestésicos locais e radicais livres, alguns estudos tem testado o uso de antioxidantes como por exemplo o ácido ascórbico, ácido hialurônico e ácido ferulico, com resultados promissores na redução do dano endotelial e epitelial dos anestésicos locais (TRIVEDI et al., 2003; TIAN, et al., 2016; GUOJIAN et al., 2018; BUCOLO et al., 2018).

O estudo da toxicidade de fármacos no endotélio da córnea é de extrema importância. Além do procedimento cirúrgico, outros inúmeros fatores, incluindo anestésicos, e corantes intraoculares podem causar dano endotelial. Isto pode comprometer a função do endotélio, principalmente porque na maioria das espécies estudadas a atividade mitótica é limitada excetuando-se os coelhos jovens (HIRSCH et al., 1975; NAUTSCHER et al., 2015). De acordo com as condições propostas para este estudo, foi possível concluir que a ropivacaína 0,75% provocou danos agudos no endotélio da córnea de equinos.

### **Considerações finais**

Foi possível com a microscopia eletrônica de varredura avaliar e comparar a perda celular endotelial induzida pela ropivacaína 0,75%. Perdas celulares ocorreram nos grupos submetidos ao tratamento com ropivacaína. Espera-se que a metodologia apresentada possa ser útil na orientação de futuras pesquisas envolvendo endotélio da córnea e anestésicos locais. Estudos in vivo serão necessários para indicar esta técnica anestésica em equinos e para entender as interações desses agentes com o endotélio da córnea de equinos. A limitação de testes in vitro é a incapacidade de replicar a farmacocinética de anestésicos in vivo ou a recuperação das células do endotélio da córnea em um ambiente mais fisiológico.

## REFERÊNCIAS

- ABIB, F.C. In: *Microscopia especular de córnea: manual e atlas*. 1.ed. Rio de Janeiro: Rio Med. Livros, 140 p, 2000.
- ABIB, F.C.; BARRETO, J.R. Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v.27, p.1574-78, 2001.
- ALBUQUERQUE L. et al. Analysis of the corneal endothelium in eyes of chickens using contact specular microscopy. *Semina Ciências Agrárias*, v.36, n.6, p. 4199-4206, 2015.
- AMORIM, T.M. et al. Effects of intracameral injection of epinephrine and 2% lidocaine on pupil diameter, intraocular pressure, and cardiovascular parameters in healthy cats. *Veterinary Ophthalmology*, 2018.
- ANDREW, S.E. et al. Density of corneal endothelial cells and corneal thickness in eyes of euthanatized horses. *American Journal of Veterinary Research*, v.62, n.4, p.479-482. 2001.
- BERCHT B.S. et al. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchilas (*Chinchilla lanigera*) in vivo. *Veterinary Ophthalmology*, v.18, n.1, p.137-142, 2015.
- BIAGGI, R.H. Estudo comparativo da sensação dolorosa em pacientes submetidos à facoemulsificação com diferentes temperaturas da solução de irrigação ocular. 89p. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de da Universidade de São Paulo (Campus Ribeirão Preto), 2013.
- BORAZAN, M. et al. Induction of apoptosis of rabbit corneal endothelial cells by preservative-free lidocaine hydrochloride 2%, ropivacaine 1%, or levobupivacaine 0.75%. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v.35, n.4, p.753-758, 2009.
- BROOKS, D.E., et al. Visual outcomes of phacoemulsification cataract surgery in horses: 1990-2013. *Veterinary Ophthalmology*. Jul;17 Suppl 1:117-28, 2014.
- BUCOLO, C. et al. Antioxidant and Osmoprotecting activity of taurine in dry eye model. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 34(1-2).10.1089/jop.2017.0008, 2018.
- CAÇA, I. The histopathological effect of intracameral ropivacaine in different concentrations on corneal endothelium. *Annals of Ophthalmology (Skokie, Ill)*. Spring;38(1):43-8. PMID: 17200584[Indexed for MEDLINE], 2006
- CHANG Y.S. et al. Cytotoxicity of lidocaine or bupivacaine on corneal endothelial cells in a rabbit model. *Cornea*, v.25, n.5, p.590-596, 2006.
- CLODE A. B., MATTHEWS, A., *Diseases and Surgery of the Cornea*. In: Gilger B, editor. *Equine Ophthalmology*. 2nd edition. Maryland Heights (MO): Elsevier Saunders; p. 185. 2011.



COLITZ, C.M.M., MCMULLEN, R.J. Diseases and surgery of the lens. In: Gilger B, editor. Equine ophthalmology. 2nd edition. Maryland Heights (MO): Elsevier Saunders; p. 282– 316, 2011.

COLLIN, S.P.; COLLIN, H.B. A comparative study of the corneal endothelium in vertebrates. *Clinical and Experimental Optometry*, v.81, n.6, p.245-254, 1998.

DELMONDE, D.W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v.37, p.588-598. 2011.

DOUGHTY M.J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelium cell morphology: a review of techniques and their application. *Optometry and Visual Science*, v.66, n.9, p.626-642. 1989.

EDELHAUSER, H.F., et al. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Archives of Ophthalmology*, v.99, p.1281-1287, 1981.

EDELMANN, M. L., et al. Retrospective evaluation of phacoemulsification and aspiration in

41 horses (46 eyes): visual outcomes vs. age, intraocular lens, and uveitis status.

*Veterinary Ophthalmology*, v.17, p.160-167, 2014.

EGGELING, P. et al. Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. v.26, n.9, p.1403-1408, 2000.

FAGANELLO, C.S. et al. Morphology of endothelial cells from different regions of the equine cornea *Ciência Rural*, v.46, n.12, p.2223-2228, 2016.

FARIAS, R.J.M., et al. Avaliação de córneas doadoras em lâmpada de fenda e microscopia especular durante o período de armazenamento. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. v. 70, n. 1, p. 79-83, 2007.

FERNANDES, M.B.C. et al. Assessing patient satisfaction with cataract surgery under topical anesthesia supplemented by intracameral lidocaine combined with sedation.

*Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.176, n.6, p.345-349, 2013.

FRANZEN, A.A. et al. Use of microscope specular to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in enucleated cats. *Veterinary Ophthalmology*, v.13, n.4, p.222-226, 2010.

GERMUNDSSON J, et al. An accurate method to determine Bowman's layer thickness in vivo in the human cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53: 2354– 2359, 2012.

GERDING, P.; & L TURNER, TERRI & E HAMOR, RALPH & SCHAEFFER, DAVID. Effects of intracameral injection of preservative-free lidocaine on the anterior segment of the eyes in dogs. *American journal of veterinary research*. 65. 1325-30. 10.2460/ajvr.2004.65.1325, 2004.

GILGER, B.C. Preface. In: *Equine Ophthalmology*. 3rd ed., Elsevier Saunders, 2017.

GUAY, J., SALES, K. Sub-Tenon's anaesthesia versus topical anaesthesia for cataractsurgery. Cochrane Data base of Systematic Reviews Issue 8. Art. No.: CD006291., 2015.

GUOJIAN, J., TINGJUN, F. "Sodium Ferulate Attenuates Lidocaine-Induced Corneal Endothelial Impairment," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 4967318, 8 pages, 2018.

GUPTA, S. K, KUMAR, A, SHARMA, A. Trojan horse anaesthesia: A novel method of anaesthesia for pars plana vitrectomy. *Oman Journal of Ophthalmology*. 2018 May-Aug; 11(2): 119–123, 2017.

GUTARRA V.R.P. et al. Dilatacion pupilar con lidocaina intracameral a 1% en pacientes submetidos a cirugía de catarata. *Archivos De Oftalmologia De Buenos Aires*, v. 81, n.1, p.105, 2011.

GUTIÉRREZ-CARMONA, F.J.; ÁLVAREZ-MARÍN, J. Randomized comparative clinical study of cryoanalgesia versus topical anesthesia in clear corneal phacoemulsification. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 31, p. 1187-1193, 2005.

GWIN, R.M. et al. Decrease in canine corneal endothelium cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.22, n.2, p. 267-271. 1982.

HIRSCH M. et al. Regeneration of corneal endothelium in the rabbit: microscopic study and relation with corneal thickness. *Archives D'ophtalmologie et Revue Générale D'ophtalmologie*, v.35, n.3, p.269-278, 1975.

HÜNNING P. S. et al. Morphology of endothelial cells from different regions of the cornea of dogs. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.48:10, 2018.

IACOBELLI, E., et al. Topical Use of Ropivacaine 1% vs Lidocaine 2% in Cataract Surgery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v.46(13):795,2015.

JIANG, G; FAN, T. Sodium Ferulate Attenuates Lidocaine-Induced Corneal Endothelial Impairment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v.8, n.1, p, 2018.

JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Experimental Eye Research*, v.95, n.1, p.16-23. 2012.

JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Progress in Retinal and Eye Research*, v.22, p.359-389. 2003.

KANG, D.K. et al. Cytotoxic effects of local anesthesia through lidocaine/ropivacaine on human melanoma cell lines. *Brazilian Journal of Anesthesiology*. Nov - Dec;66(6):594602, 2016.

KASHYAP, A. et al. Comparison between ropivacaine and bupivacaine in deep topical fornix nerve block anesthesia in patients undergoing cataract surgery by phacoemulsification. *Indian Journal of Ophthalmology*. [serial online], 2018.

KHAZBAK, L. et al. Effect of Intracameral Injection of Lidocaine and Ropivacaine on Rabbit Corneal Endothelium and Trabecular Meshwork. *Bulletin of the*

*Ophthalmological Society of Egypt*, V. 99, Number 1, p. 29-33, 2006.

KLAUMANN, P.R.; OTERO, P. E. Anestesia Locoregional em Pequenos Animais. São Paulo, Roca,2013, 268p.

KLAMT, Jyrson Guilherme et al. Anestesia peridural contínua com ropivacaína a 0,2% associada a anestesia geral para cirurgia do abdômen superior em crianças. Revista Brasileira de Anestesiologia., Campinas, v. 53, n. 2, p. 160-168, Abril. 2003.

KUTHIALA, G.; CHAUDHARY, G. Ropivacaine: A review of its pharmacology and clinical use. Indian Journal of Anaesthesia, v.55, p. 104-110, 2011.

LAING, R.A. et al. Changes in the corneal endothelium as a function of age. Experimental Eye Research, v.22, p.587-594. 1976.

LEDBETTER, E. C., SCARLETT, J. M. In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. Veterinary Ophthalmology, 12: p. 57-64, 2009.

LEE, R.M.H., THOMPSON, J.R., EKE, T. Severe adverse events associated with local anaesthesia in cataract surgery: 1 year national survey of practice and complications in the UK. British Journal of Ophthalmology. 100: p. 772– 776, 2016.

LIOU S.W. et al. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. Journal of Cataract and Refractive Surgery. v.30, n.6, p.1351-1355, 2004.

LOCKINGTON, D. et al. Presence of free radicals in intracameral agents commonly used during cataract surgery. Br. Journal of Ophthalmology. v. 94, p. 1674-1677, 2010.

MARTINI, E., et al. Lidocaine versus ropivacaine for topical anesthesia in cataract surgery.

Journal of Cataract & Refractive Surgery. v. 28, p. 1018–1022, 2002.

NAKANO, Celso Takashi et al. Comparison of central corneal edema and visual recovery between liquefaction and conventional phacoemulsification in soft cataracts. Rev. bras.oftalmol., Rio de Janeiro , v. 68, n. 1, p. 7-12, Feb. 2009.

NAUTSCHER, N. et al. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea.

Veterinary Ophthalmology. Jul; v. 19(4), p. 297–304, 2016

OJEDA, J.L. et al. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach. Journal of Anatomy, v.109, n.5, p.67-576. 2001.

OLIVER, J. A. and BRADBROOK, C. A. (2013), Suspected brainstem anesthesia following retrobulbar block in a cat. Veterinary Ophthalmology, 16: 225-228.

PARK, S.A. et al. Evaluation of the analgesic effect of intracameral lidocaine hydrochloride injection on intraoperative and postoperative pain in healthy dogs undergoing phacoemulsification. American Journal of Veterinary Research. v.71, n.2, p 216-222, 2010.

PEIFFER, R.L. et al. Specular microscopy observations of clinically normal feline corneal endothelium. American Journal of Veterinary Research, v.42, n.5, p.854-855. 1981.

- PESCOSOLIDO, N., et al. Cataract Surgery Complications: An in vitro Model of Toxic Effects of Ropivacaine and Lidocaine. *Drugs in R&D*. v. 11, n.1, p. 303-307, 2011.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Análise morfométrica do endotélio corneano de coelhos à microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.41-45, 2005a.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Corneal endothelium of the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) by scanning electron microscopy. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.36, n.4, p.702-705. 2005b.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Density of corneal endothelial cells in eyes of dogs using specular microscopy. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.43, n.4, p.476-480, 2006.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Morphological analysis of the corneal endothelium in eyes of dogs using specular microscopy. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n.9, p.427-430, 2008.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Morphometric analysis of the corneal endothelium of yacare caiman (*Caiman yacare*) using scanning electron microscopy. *Veterinary Ophthalmology*, v.7, n.3, p.205-208, 2004.
- PIGATTO, J.A.T. et al. Scanning electron microscopy of the corneal endothelium of ostrich. *Ciencia Rural*, v.39, n.3, p.926-929. 2009.
- RODRIGUES, G.N. et al. Corneal endothelium cell morphology of normal dogs in different ages. *Veterinary Ophthalmology*, v.9, n.2, p.101-107, 2006.
- TRIVEDI R.H., WERNER, L., APPLE, D.J., IZAK, A.M., PANDEY, S.K., MACKY, T.A. Viscoanesthesia Part I: Toxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, v. 29, p. 550 –555, 2003.
- SHELLINI, S.A, CREPPE M.C, GREGÓRIO EA, PADOVANI C.R. Lidocaine effects on corneal endothelial cell ultrastructure. *Veterinary Ophthalmology*. 10(4):239–244, 2007.
- SEGARRA, G. et al. A dose-escalation ex vivo study on the effects of intracameral benzalkonium chloride in rabbits. *BMC Veterinary Research*. 14:39, p.1-9, 2018
- SHENG, H.; BULLIMORE, M.A. Factors affecting corneal endothelium morphology. *Cornea*, v.26, p.520-525. 2007.
- SHILO-BENJAMINI, J. A review of ophthalmic local and regional anesthesia in dogs and cats, *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, Volume 46, Issue 1, P. 14-27, 2019.
- SILVA, V. R. M. et al. Evaluation of equine corneal endothelium after exposure to 0.5% indocyanine green - in vitro study. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 39, n. 2, p. 613-620, mar./abr, 2018.
- SIT, M. et al. Corneal graft outcome study. *Cornea*. 2001;20(2):129-33, 2001.
- SOKER, C., et al. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*: September-October, v..29, n. 5, p. 96-101, 2004.

- TAMAYO-ARANGO, L. J. et al. Ultrastructure, morphology and morphometry of a normal corneal endothelium of adult crossbred pig. *Ciência Rural*, v.9, n.1, p.117-122, 2009.
- TAN, J.H.Y.; BURTON, R.L. Does preservative-free lignocaine 1% for hydrossection reduce pain during phacoemulsification? *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. v.26, n.5, p.733-735, 2000.
- TERZARIOL, M. et al. Effects of intracameral brilliant blue on the corneal endothelium of swine: in vitro study. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, n.8, p. 775-780, 2016
- TIAN, J., YAN, L. Efeitos comparativos de vitamina C sobre os efeitos dos anestésicos locais ropivacaina, bupivacaina e lidocaína em condrócitos humanos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. P. 29-36, 2016.
- TORRES-MORENO, A.J. Anestesia tópica com soluciones frias em facoemulsificación. *Revista Mexicana de Oftalmologia*, v. 83, p. 197-200, 2009.
- TOWNSEND, W. Disease and Surgery of the Equine Lens. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. v.33, n.3, p. 483-497, 2017.
- TRAN T.L. et al. Aquaporins in the Eye. In: Yang B. (eds) *Aquaporins. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Dordrecht, v. 969, p. 193-198, 2017.
- TUFT, S. J. COSTER, D.J. The corneal endothelium. *Eye*, v.4, p. 389-424. 1990.
- VALIMAKI J, TORNBLOM R. Viscoanaesthesia in cataract surgery: a prospective, randomized clinical trial. *Acta Ophthalmol*. v.87, p 378-381, 2009.
- WANG, L. et al. Combined Topical-Intracameral Anesthesia in Manual Small-Incision Cataract Surgery: A Prospective, Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Trial. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. v. 1, p. 9-14, 2013.
- WARING, G. O. et al. The corneal endothelium. *Ophthalmology*, v.89, p.531-590. 1982.
- WARING, G.O. et al. Four methods of measuring human corneal endothelium cells from specular photomicrographs. *Archives of Ophthalmology*, v.98, p.848-855. 1980.
- WEN Q. et al. Cytotoxicity of proparacaine to human corneal endothelial cells in vitro. *The Journal of Toxicological Sciences* , v.40, n.4, p.427-436, 2015.
- YEE, R.W. et al. Specular microscopy of vertebrate corneal endothelium: a comparative study. *Experimental Eye Research*, v. 44, p.703-714, 1987.
- ZHANG, S. et al. Cryo-irrigation in phacoemulsification facilitates a quicker cornea endothelia recovery. *Canadian Journal of Ophthalmology*, v. 44, p. 446-450, 2009.