

Método simplificado para o desenvolvimento do glaucoma experimental

José Ricardo Carvalho Lima Rehder *

As dificuldades encontradas quando se analisam as alterações morfológicas e funcionais, sob o ponto de vista etiopatogênico, presentes em olhos glaucomatosos e determinadas pela hipertensão intra-ocular, levaram-nos a pesquisar um método para estabelecer um modelo experimental de glaucoma.

DUKE-ELDER², em 1945, classificou esses métodos em dois grupos:

1. Quando ocorre a produção de uma condição permanente de estase vascular.

2. Quando ocorre um bloqueio da circulação intra-ocular de fluidos.

HUGGERT⁵, em 1957, utilizando-se de várias técnicas para obstrução das vias de drenagem no humor aquoso em olhos de coelhos, produziu hipertensão intra-ocular por um período de três semanas.

KUPFER⁶, em 1962, obteve hipertensão intra-ocular em coelhos, introduzindo um tubo de polietileno no ângulo da câmara anterior e analisou as alterações observadas no nervo óptico e retina.

CARVALHO¹, em 1962, estabeleceu o glaucoma experimental através de injeção de uma solução fisiológica contendo fragmentos de algodão na câmara anterior em olhos de coelhos.

LEVY^{7,8}, em 1974, estabeleceu hipertensão intra-ocular unilateral através da injeção de quimotripsina na câmara posterior em olhos de macacos e, em 1977, através de fotocoagulação com laser de argônio da região do trabeculado.

QUIGLEY e ADDICKS⁹, em 1980, descreveram um método para o estabelecimento de glaucoma experimental em macacos através da injeção de hemácias autólogas fixadas em glutaraldeído.

Após a revisão da literatura, os resultados obtidos com os métodos citados, em nossas mãos, não foram satisfatórios com o que concluímos ser importante a padronização de um método, não só eficaz, como também de simples execução, em nosso meio, para o desenvolvimento do glaucoma experimental.

Assim sendo, procurou-se modificar em alguns aspectos o método descrito por QUIGLEY e ADDICKS em 1980, com o intuito

de simplificar e assim conseguir os objetivos propostos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho de investigação foram utilizados 20 coelhos albinos, machos, adultos, endogâmicos, com peso entre 2.500 e 4.000 g, distribuídos em dois grupos, subdivididos em A e B (1.A, 1.B, 2.A e 2.B).

A pressão intra-ocular foi medida diariamente pela manhã, com tonômetro de Schiötz, após anestesia tópica.

A hipertensão intra-ocular foi induzida apenas no olho direito dos animais, ficando o olho esquerdo como controle.

No grupo 1.A, o olho direito do coelho foi mantido com hipertensão por 7 dias. No grupo 1.B o olho direito do coelho foi mantido com hipertensão por 7 dias, submetido a cirurgia fistulizante e observado por um período de 15 dias com pressão intra-ocular normalizada.

No grupo 2.A, manteve-se a hipertensão intra-ocular por um período de 28 dias. No grupo 2.B, o olho direito do coelho foi mantido com hipertensão por 28 dias. Em seguida, através de cirurgia fistulizante, normalizou-se a pressão intra-ocular e manteve-se o coelho em observação por 15 dias.

Os coelhos dos grupos 1.B e 2.B foram todos submetidos a cirurgia fistulizante com a técnica de Scheie-Malbrán.

Para a produção de hipertensão intra-ocular, inicialmente, fez-se a tricotomia e asepsia da orelha esquerda do coelho e, com auxílio de um "butterfly" n.º 23 e uma seringa de 10 ml, previamente heparinizados, retirou-se 5 ml de sangue da veia marginal. Este volume de sangue, dividido e distribuído em três tubos de uma centrífuga (Excel-sa 2, marca Fanem), foi dissolvido em 4 vezes o seu volume em uma solução de sacarose 0,25 M, sendo, a seguir, centrifugada a 1.000 rpm, durante 30 minutos. Após aspirar o sobrenadante, o aglomerado de hemácias foi novamente dissolvido em 4 vezes o seu volume em uma solução de sacarose 0,25 M e centrifugado a 1.000 rpm.

* Prof. Titular da Faculdade de Medicina do ABC. Prof. Adjunto-Doutor da Escola Paulista de Medicina. Disciplina de Oftalmologia — Escola Paulista de Medicina — Rua Botucatu, 822 — CEP 04023 — São Paulo — Brasil.

O aglomerado de hemácias assim obtido foi suspenso em 10 vezes o seu volume em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato por 1 hora. Após este período de repouso, a solução foi centrifugada por 15 minutos e após a aspiração do sobrenadante as hemácias precipitadas foram dissolvidas em 4 vezes o seu volume em uma solução salina a 0,9% com a finalidade de remover o fixador.

É necessário que esta etapa seja repetida pelo menos por 7 vezes. Após este processamento, as hemácias fixadas resultantes foram dissolvidas em igual volume de solução salina a 0,9%, sendo 0,1 ml dessa solução injetado na câmara anterior do olho direito dos coelhos. Para tanto, os animais foram submetidos a anestesia geral com uma solução de nembutal sódico (50 mg/ml), preparada na hora do exame, injetando-se 0,5 ml/kg de peso do animal na veia marginal.

O coelho imobilizado e preso a uma canaleta de madeira, após ser submetido ao exame ocular com auxílio de um microscópio cirúrgico marca D.F Vasconcelos tinha sua pressão intra-ocular de ambos os olhos, medida com tonômetro de Schiötz. Mantendo-se o olho aberto através de um blefarostato, fixando-se a conjuntiva bulbar com uma pinça de fixação e utilizando-se uma agulha 25 x 7 adaptada a uma seringa de 1 ml, fazia-se a paracentese e aspiração na região limbica esvaziando-se totalmente a câmara anterior. A seguir, trocava-se a se-

ringa por outra, contendo a solução de hemácias fixadas e injetava-se 0,1 ml.

Ao se retirar a agulha da câmara anterior, tamponava-se a abertura com um cotonete por alguns segundos, lavava-se os fórnxes conjuntivais com solução fisiológica, aplicava-se pomada oftálmica de antibiótico e corticosteróide no olho direito e o coelho era levado para uma gaiola individual, mantida em condições normais de higiene.

Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste "t" de Student para dados pareados e, análise de variância complementada pelo teste de contrastes de Tukey.

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição para a hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

RESULTADOS

Os coelhos do grupo 1.A, nos quais a hipertensão intra-ocular foi mantida por 7 dias apresentaram a pressão intra-ocular média de 33,24 mmHg no olho direito e a pressão média de 16,06 mmHg no olho esquerdo, controle.

Após a análise estatística desses dados através da aplicação do teste "t" de Student para dados pareados, observou-se que a média de pressão intra-ocular do olho direito diferiu significativamente em relação ao olho controle (Tabela 1).

TABELA 1
Pressão intra-ocular (mmHg) dos olhos direito (D) e esquerdo (E) dos coelhos nos diversos grupos

Grupo 1.A		Grupo 1.B		Grupo 1.B		Grupo 2.A		Grupo 2.B		Grupo 2.B'	
Olho		Olho		Olho		Olho		Olho		Olho	
D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
35,80	13,50	33,80	19,40	18,00	16,50	33,90	16,30	40,95	17,60	22,40	15,70
35,00	16,00	36,80	16,00	16,30	15,30	32,50	21,10	38,61	16,87	17,63	17,30
33,11	16,50	37,60	15,30	16,70	16,20	32,00	16,10	39,86	17,53	19,63	17,30
28,80	16,00	39,30	16,20	15,20	16,30	35,50	21,00	37,37	15,67	20,90	15,90
33,50	15,30	39,50	15,50	16,50	16,60	37,30	15,80	38,20	17,00	15,60	15,40
$\bar{X}$	33,24	$\bar{X}$	16,06	$\bar{X}$	16,56	$\bar{X}$	16,18	$\bar{X}$	16,93	$\bar{X}$	16,32
DP	2,71	DP	0,49	DP	1,00	DP	0,52	DP	0,78	DP	0,91

Teste "t" de Student para dados pareados (Direito X Esquerdo)

Grupo 1.B — "t" calculado = 14,43*

Grupo 1.B — (Antes CG) — "t" calculado = 12,70*

Grupo 1.B' — (Depois CG) — "t" calculado = 0,85

Grupo 2.A — "t" calculado = 9,48*

Grupo 2.B — (Antes CG) — "t" calculado = 59,96*

Grupo 2.B' — (Depois CG) — "t" calculado = 3,38*

"t" crítico = t(4 gl; 0,05) = 2,78

Os coelhos do grupo 1.B, nos quais a hipertensão intra-ocular foi mantida por 7 dias, apresentaram a pressão intra-ocular média de 37,40 mmHg no olho direito e a pressão intra-ocular média de 16,68 mmHg no olho esquerdo, controle.

Após terem sido submetidos a cirurgia fistulizante no olho direito e observados du-

rante 15 dias, a pressão intra-ocular média do olho direito foi de 16,56 mmHg e a pressão intra-ocular média do olho esquerdo, controle, foi de 16,18 mmHg.

A análise estatística mostrou que a média da pressão intra-ocular do olho direito não foi significativamente maior que a observada no olho esquerdo (Tabela 1).

Os coelhos do grupo 2.A, nos quais a hipertensão intra-ocular foi mantida por um período de 28 dias, apresentaram a pressão intra-ocular média de 34,20 mmHg no olho direito e a pressão intra-ocular média de 18,06 mmHg no olho esquerdo, controle.

A análise estatística através da aplicação do teste "t" de Student para dados pareados mostrou que a média da pressão intra-ocular do olho direito foi significativamente maior do que a observada no olho controle (Tabela 1).

Os coelhos do grupo 2.B, nos quais a hipertensão intra-ocular foi mantida por um período de 28 dias, apresentaram pressão intra-ocular média de 39,03 mmHg no olho direito e 16,93 mmHg no olho esquerdo, controle. Após terem sido submetidos a cirurgia fistulizante no olho direito e observados durante 15 dias, a pressão intra-ocular média do olho direito foi de 20,02 mmHg e a pressão intra-ocular média do olho esquerdo, controle foi de 16,32 mmHg.

A análise estatística mostrou que a média da pressão intra-ocular do olho direito diferiu significativamente daquela observada no olho controle (Tabela 1).

Quando se fez o estudo estatístico para as diferenças (D-E) dos vários grupos, verificou-se que a análise de variância, complementada pelo teste de contrastes de Tukey, mostrou que a média da pressão intra-ocular do grupo 1.B foi significativamente maior do que a observada nos grupos 2.A e 2.B, enquanto que o grupo 2.A mostrou uma média da pressão intra-ocular significativamente maior do que a do grupo 2.B.

DISCUSSÃO

Numerosos modelos experimentais de glaucoma já foram testados em vários animais e discutidos exaustivamente (DUKE-ELDER², 1945; HUGGERT⁵, 1957; FLOCKS³ e col., 1959; CARVALHO¹, 1962; ZIMMERMAN¹⁰ e col., 1967; GAASTERLAND & KUPFER⁴, 1974; LEVY^{7,8}, 1977, QUIGLEY & ADDICKS⁹, 1980). Entretanto, ao se compulsar a literatura, constatou-se que, em nosso meio, poucos são os trabalhos onde se procura incentivar a pesquisa em animais com a finalidade de desenvolver estudo do glaucoma.

Assim sendo, modificou-se o método estabelecido por QUIGLEY & ADDICKS⁹, 1980, para a produção de glaucoma experimental, pois, observou-se que quando da preparação da solução de hemácias fixadas em glutaraldeído, seguindo rigorosamente esse método e após a injeção desta solução na câmara

anterior dos olhos dos coelhos, em muitos deles ocorria um processo inflamatório intra-ocular intenso, surgindo a necessidade de sacrificá-los e consequentemente, eliminá-los da pesquisa. Contudo, quando se retirou completamente o glutaraldeído usado para fixação do material, dissolvendo-se o aglomerado de hemácias em solução salina e repetindo-se esta etapa maior número de vezes que o preconizado por QUIGLEY & ADDICKS⁹, 1980, obteve-se uma solução final que não determinou um processo inflamatório intenso quando injetada na câmara anterior dos olhos dos coelhos, mas apenas uma reação discreta, transitória e restrita ao segmento anterior.

RESUMO

A injeção na câmara anterior de olhos de coelhos, de hemácias autólogas fixadas em glutaraldeído determina um aumento constante e duradouro da pressão intra-ocular.

A técnica cirúrgica utilizada determina uma diminuição estatisticamente significativa da pressão intra-ocular.

SUMMARY

Prolonged and controlled high intraocular pressure was artificially produced in rabbit eye by injection of autologous fixed red blood cells into the anterior chamber.

The surgical technique used determines a statistically significant decrease of the intraocular pressure.

BIBLIOGRAFIA

1. CARVALHO, C. A. — Histopathology of retina and optic nerve with experimental glaucoma. Arch. Ophthalmol., 67: 123-126, 1962.
2. DUKE-ELDER, S. — Diseases of the inner eye. In: Text-book of Ophthalmology, USA, C.V. Mosby, 1945.
3. FLOCKS, M.; TSUKAHARA, I. & MILLER, J. — Mechanically induced glaucoma in animals. Amer. J. Ophthalmol., 48: 11-18, 1959.
4. GAASTERLAND, D. & KUPFER, C. — Experimental glaucoma in the rhesus monkey. Invest. Ophthalmol., 13(6): 455-457, 1974.
5. HUGGERT, A. — Obstruction of the outflow of aqueous humor, produced experimentally. Acta Ophthalmol., 35(1): 1-11, 1957.
6. KUPFER, C. — Studies of intraocular pressure: II. The histopathology of experimentally increased intraocular pressure in the rabbit. Invest. Ophthalmol., 1: 455-479, 1974.
7. LEVY, N. S. — The effects of elevated intraocular pressure on slow axonal protein flow. Invest. Ophthalmol., 13(9): 691-695, 1974.
8. LEVY, N. S. — The effect of elevated intraocular pressure on axoplasmic transport in the optic nerve of the rhesus monkey. Doc. Ophthalmol., 43(2): 181-216, 1977.
9. QUIGLEY, H. A. & ADDICKS, E. M. — Chronic experimental glaucoma in primates. I. Production of elevated intraocular pressure by anterior chamber injections of autologous ghost red blood cells. Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 19: 126-136, 1980.
10. ZIMMERMAN, L. E.; DE VENEZIA, G. & HAMASAKI, D. I. — Pathology of the optic nerve in experimental acute glaucoma. Invest. Ophthalmol., 6: 109-125, 1967.