

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

**Inflamação conjuntival subclínica em pacientes com
glaucoma primário de ângulo aberto e resultados
cirúrgicos de trabeculectomia**

JOÃO MARCELLO FORTES FURTADO

RIBEIRÃO PRETO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO MARCELLO FORTES FURTADO

**Inflamação conjuntival subclínica em pacientes com
glaucoma primário de ângulo aberto e resultados
cirúrgicos de trabeculectomia**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

RIBEIRÃO PRETO

2010

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

Furtado, João Marcello Fortes

Inflamação conjuntival subclínica em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto e resultados cirúrgicos de trabeculectomia.

Ribeirão Preto, 2010.

98p.: il.; 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.

Orientadora: Rodrigues, Maria de Lourdes Veronese

1. Inflamação; 2. Conjuntiva; 3.HLA-DR; 4. Trabeculectomia;
5. Glaucoma.

Suporte Financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai, que sempre me apoiou e torceu por mim, seja nos jogos de futebol quando eu era criança, nas corridas de rua, na Tese de Doutorado, e mesmo antes de eu nascer.

À minha mãe, ao meu avô e à minha avó, que sempre me apoiaram a buscar os meus sonhos.

À Taciana, minha esposa, companheira e amiga, por quem meus olhos brilham cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, que durante esse tempo foi, não só uma orientadora, mas também conselheira, amiga em todos os momentos e um exemplo como professora, pesquisadora e, sobretudo, como pessoa.

Aos Professores Jayter S. de Paula, Eduardo M. Rocha e Erasmo Romão, pela ajuda e valiosos conselhos dados ao longo da Residência Médica e do Doutorado.

Agradeço ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares, Ana Maria da Rocha, Régia C. Lira, Neifi H. S. Dhegaide e Prof. Dr. Eduardo A. Donadi, pela importante ajuda e orientação em todas as fases deste trabalho.

Agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar do estudo. Muito obrigado pelo carinho demonstrado em cada consulta.

Agradeço também a todos os colegas residentes, médicos contratados, enfermeiras da Divisão de Oftalmologia e funcionários da Secretaria do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Vocês fizeram desta tese, não uma conquista minha, mas sim de todos que participaram deste trabalho em equipe.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU-	5-fluoruracil
A-	Azopt (brinzolamida 1%)
AG-	Agulhamento
B-	Betaxolol 0,5%
BSS	<i>Balanced saline solution</i>
CG-	Combigan (Maleato de Timolol 0,5% e Tartarato de Brimonidina 0,2%)
CPH-	Complexo Principal de Histocompatibilidade
D-	Cloridrato de Dorzolamida 2%
F-	Feminino
FACO-	Facoemulsificação
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HA-	Humor Aquoso
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HE-	Hematoxilina-Eosina
HLA-	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HLA-DR-	<i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
HLA-DR+-	Marcação positiva para o anticorpo anti-HLA-DR
L-	Lumigan (Bimatoprost 0,03%)
M-	Masculino
Med-	Medicação antiglaucomatosa

MT-	Maleato de Timolol 0,5%
OD-	Olho Direito
OE-	Olho Esquerdo
PBS-	<i>Phosphate buffered saline</i>
PIO-	Pressão intra-ocular
SP-	Sucesso Parcial
ST-	Sucesso Total
T-	Travatan (travoprostá 0,004%)
TB-	Tartarato de Brimonidina 0,2%
X-	Xalatan (latanoprostá 0,005%)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Distribuição dos participantes incluídos no estudo segundo o sexo e a idade (n=28)	50
Figura 2:	Técnica de sutura removível utilizada no estudo. Ilustrações feitas por Juliette Watts. Fonte: (Barros et al., 2008)	52
Figura 3:	Lâmina corada com HE evidenciando reação inflamatória (seta). Aumento de 400x	68
Figura 4:	Ausência de reação inflamatória em lâmina corada com HE (seta). Aumento de 400x	68
Figura 5:	Epitélio conjuntival apresentando marcação para o anticorpo anti-HLA-DR (seta). Aumento de 400x	70
Figura 6:	Epitélio conjuntival apresentando ausência de marcação para o anticorpo anti-HLA-DR (seta). Aumento de 400x	71
Figura 7:	Contagem de células positivas e negativas para a análise quantitativa. (A) fragmento da biópsia conjuntival; (B) o mesmo fragmento no momento da contagem das células positivas e negativas para o anticorpo anti-HLA-DR. As células positivas estão representadas em verde (seta preta), e as negativas em vermelho (seta amarela). Aumento de 400x	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Complicações verificadas em 22 das 34 cirurgias.....	62
Tabela 2: Olhos incluídos no Grupo 1 (sucesso total) aos seis meses de pós-operatório.	63
Tabela 3: Olhos incluídos no Grupo 2 (sucesso qualificado) aos seis meses de pós-operatório.	64
Tabela 4: Olhos incluídos no Grupo 3 (falha da trabeculectomia) aos seis meses de pós-operatório.....	65
Tabela 5: Olhos incluídos no Grupo 4 (sucesso total) aos seis meses de pós-operatório	66
Tabela 6: Pacientes pertencentes ao Grupo 5 (sucesso qualificado) aos dois anos de acompanhamento pós-operatório	66
Tabela 7: Olhos incluídos no Grupo 6 (falha da trabeculectomia) aos 24 meses de pós-operatório.....	67
Tabela 8: Reação inflamatória verificada em lâminas coradas com HE.....	69
Tabela 9: Análise qualitativa e quantitativa da expressão de HLA-DR.....	70

RESUMO

FURTADO, J.M.F. **Inflamação conjuntival subclínica em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto e resultados cirúrgicos de trabeculectomia.** 2010. 98f - Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introdução: Pacientes em uso de drogas antiglaucomatosas desenvolvem inflamação conjuntival clínica ou subclínica, mas não é claro se esta inflamação afeta os resultados cirúrgicos da trabeculectomia. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é verificar se há correlação entre expressão conjuntival do marcador imunogenético HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen-DR*) e pela presença de neutrófilos em lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) e resultados da trabeculectomia em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto. **Pacientes e Métodos:** O estudo foi conduzido em 28 pacientes (34 olhos) portadores de glaucoma primário de ângulo aberto submetidos à trabeculectomia. Biópsias de conjuntiva bulbar inferior foram coletadas no momento da cirurgia e preparadas para análise imunohistoquímica e também coradas com HE. A expressão de HLA-DR no epitélio conjuntival foi determinada por microscopia óptica, e submetida à análise quantitativa e qualitativa. Nas lâminas coradas com HE foi avaliada a presença de neutrófilos indicando atividade inflamatória. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de sucesso e o de falha cirúrgica. **Conclusão:** Não há correlação entre inflamação conjuntival e falência de trabeculectomias em análises da expressão de HLA-DR e também pela verificação de neutrófilos em lâminas coradas por HE.

Palavras-chave: Inflamação; Conjuntiva; HLA-DR; Trabeculectomia; Glaucoma.



ABSTRACT

FURTADO, J.M.F. **Subclinical conjunctival inflammation in primary open-angle glaucoma patients and outcomes of trabeculectomy.** 2010. 98f - Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Purpose: Patients using antiglaucomatous drugs may develop sub-clinical or clinical conjunctival inflammation, but it is not clear if this inflammation affect the surgical outcomes of the trabeculectomy. **Objective:** The objective of this study is to verify if there is correlation between conjunctival expression of the immunogenetic marker HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-DR) and surgical results in patients with primary open-angle glaucoma submitted to trabeculectomy. **Patients and Methods:** The study was conducted on 28 patients (34 eyes) with primary open-angle glaucoma submitted to trabeculectomy. Inferior biopsies of the bulbar conjunctiva were collected at the moment of the surgery and prepared for immunohistochemical analysis and also stained with Hematoxylin-eosin (HE). The expression of HLA-DR in conjunctival epithelial cells was determined by light microscopy, and submitted to both qualitative and quantitative analyses. In slides stained with HE, it was evaluated the presence of neutrophils indicating inflammatory reaction. **Results:** No significant differences were found between the success and the failure group. **Conclusion:** There is no correlation between conjunctival inflammatory reaction and trabeculectomy failure, in analysis of the expression of HLA-DR and also by the verification of neutrophils through the HE staining.

Key-words: Inflammation; Conjunctiva; HLA-DR; Trabeculectomy; Glaucoma.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	33
2- OBJETIVO.....	43
3- PACIENTES E MÉTODOS.....	47
3.1. Técnica cirúrgica.....	51
3.2. Pós-operatório	53
3.3. Definição de sucesso cirúrgico	55
3.4. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)	55
3.5. Reação de imunohistoquímica (HLA-DR).....	56
3.6. Análise qualitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR.....	57
3.7. Análise quantitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR.....	57
3.8. Análise qualitativa da reação inflamatória em biópsias coradas com HE.....	58
4- RESULTADOS	59
4.1. Complicações cirúrgicas.....	61
4.2. Divisão dos grupos de acordo com os resultados cirúrgicos aos seis meses de pós-operatório.....	62
4.3. Divisão dos grupos de acordo com os resultados da trabeculectomia aos 24 meses de pós-operatório	65
4.4. Análise das lâminas preparadas em Hematoxilina-Eosina (HE)	67
4.5. Análise qualitativa e quantitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR.....	69
4.6. Análise do sucesso cirúrgico e reação inflamatória conjuntival para seis meses de seguimento pós-operatório.....	72
4.7. Análise do sucesso cirúrgico e reação inflamatória conjuntival para 24 meses de seguimento pós-operatório.....	73
5- DISCUSSÃO.....	75
6- CONCLUSÃO.....	83
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8- ANEXOS.....	95

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O glaucoma é uma das principais causas de cegueira no mundo, e pode ser definido como uma neuropatia óptica crônica, com perda de fibras da camada nervosa da retina e, conseqüentemente, com perda de campo visual, e, na maioria das vezes, também está associado a aumento da pressão intra-ocular (PIO) (1, 2). A doença pode levar à baixa de visão progressiva, e em casos mais avançados, à cegueira (3). O diagnóstico precoce e tratamento adequado são muito importantes, pois a perda de visão ocorre de maneira irreversível (4).

Idade avançada, raça negra, história familiar, PIO elevada, espessura central da córnea mais fina e aumento da relação escavação/disco óptico são considerados fatores de risco para a doença. Dentre eles, a PIO elevada é o único que pode ser alterado pela terapia antiglaucomatosa (5).

Existem basicamente duas modalidades de tratamento aceitas para esta doença: medicamentoso e cirúrgico. O tratamento ideal seria aquele capaz de causar a cura definitiva da doença, com baixo custo, fácil posologia e sem efeitos colaterais. Entretanto, esse tipo de tratamento não existe, e em ambas as opções, a intenção é abaixar o valor da PIO, para que o dano glaucomatoso não progrida (6).

As drogas usadas no tratamento clínico do glaucoma são os beta-bloqueadores, agonistas adrenérgicos (alfa-agonistas), inibidores da anidrase carbônica, colinérgicos, agentes hiperosmóticos e análogos da prostaglandina.

Os beta-bloqueadores são usados no tratamento do glaucoma há mais de 30 anos, e durante muito tempo foram a primeira escolha no tratamento da doença. Atuam diminuindo a PIO por meio da redução da produção do humor aquoso (HA), e não apresentam efeito significativo em sua drenagem. Dentre eles, a droga mais usada no Brasil é o Maleato de Timolol 0,5% (7), um beta-bloqueador não seletivo (8).

Dentre os agonistas alfa-adrenérgicos, o que está disponível no Brasil é o Tartarato de Brimonidina (0,2% e 0,15%), um agonista altamente seletivo do

receptor alfa 2. Esta droga diminui a PIO ao reduzir a produção do HA e aumentar a drenagem da via úveo-escleral (9). O Tartarato de Brimonidina 0,2% está disponível no mercado também em associação com o Maleato de Timolol 0,5%.

Os inibidores da anidrase carbônica agem diminuindo a produção do HA, e são disponíveis em apresentações via oral ou tópica. Dentre essas drogas, as disponíveis para uso em pacientes glaucomatosos são a Acetazolamida (via oral), Brinzolamida (10) e Dorzolamida (11) (tópicas). A enzima anidrase carbônica está presente no epitélio não pigmentado do corpo ciliar, e é vital para a produção de HA (12).

Os colinérgicos são as drogas mais antigas utilizadas em glaucoma. Nesta classe de drogas, a Pilocarpina é a mais conhecida e utilizada. Sua ação hipotensora se dá graças ao aumento da drenagem do HA por sua via convencional, além de diminuir sua produção (8).

Os agentes hiperosmóticos são utilizados de maneira sistêmica (via oral ou endovenoso), quando desejamos uma rápida redução da PIO. As medicações disponíveis são o glicerol (via oral) e o manitol (endovenoso) (8).

Os análogos de prostaglandina são as drogas mais recentemente lançadas no mercado, e hoje em dia são consideradas de primeira escolha no tratamento antiglaucomatoso (13). Elas diminuem a PIO, principalmente por meio do aumento da drenagem da via úveo-escleral (14). O HA drenado pela via úveo-escleral flui através do espaço extracelular no músculo ciliar, e através do espaço supracoroidal atinge o pólo posterior do globo ocular (15). Têm como vantagem a fácil posologia (uma vez ao dia), e alta potência em abaixar a PIO (16). Latanoprost, Bimatoprost e Travoprost são as drogas disponíveis no mercado brasileiro. Além disso, existem medicações no mercado que associam um análogo de prostaglandina e um beta-bloqueador no mesmo frasco.

A cirurgia antiglaucomatosa mais realizada é a trabeculectomia (17), descrita inicialmente por Cairns em 1968 (18), e que tem como propósito aumentar a drenagem do HA por meio da construção de uma fístula no ângulo

iridocorneano. Esta fístula é protegida em parte pela esclera, e esta é recoberta pela conjuntiva. É o procedimento cirúrgico mais efetivo em relação à redução da PIO (19).

O fluxo de HA pela fístula cirúrgica causa a formação de uma bolha, deixando a conjuntiva local elevada. Uma bolha ampla, aliada a valores desejados de PIO, nos sugere que o procedimento cirúrgico está funcionando.

As vantagens da trabeculectomia em relação à medicação antiglaucomatosa são: menor flutuação da PIO (20, 21) e menor custo para o paciente para a obtenção de medicamentos, além de que, o tratamento não depende da aderência do paciente ao uso correto da medicação (21). Porém, como todo procedimento cirúrgico, existem complicações relacionadas como: catarata, descolamento de coróide, vazamento da ferida cirúrgica (seidel positivo), blebite (infecção da ampola filtrante) e maculopatia hipotônica (19).

Em recente estudo retrospectivo, Folgar et al. (2010) compararam a progressão das perdas no campo visual em olhos de pacientes com glaucoma não controlado, mesmo em uso de medicações. O procedimento cirúrgico (trabeculectomia) foi capaz de reduzir a progressão do dano glaucomatoso (22).

As drogas tópicas utilizadas no tratamento clínico dos glaucomas podem causar vários efeitos colaterais, entre eles reação inflamatória em tecidos oculares, incluindo a conjuntiva bulbar e o tecido subconjuntival (23, 24).

Como o sucesso da cirurgia baseia-se na manutenção desta fístula, qualquer mecanismo que cause aumento na inflamação e cicatrização local pode, em teoria, aumentar a chance de falha do procedimento.

Os mecanismos de reparo tecidual ocorrem de maneira semelhante na conjuntiva e na pele. Após o dano tecidual (causado, por exemplo, por trauma químico), ocorre inflamação e formação de coágulos, que levam à liberação de hormônios, fatores celulares e de crescimento, resultando em reparo e formação de cicatrização local.

A formação de coágulos ou a liberação de hormônios após o dano vascular podem levar à migração de tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, monócitos e fibroblastos.

As células epiteliais secretam fator de crescimento de células endoteliais, e os macrófagos liberam Interleucina-1.

Os fibroblastos produzem elastina, colágeno e mucopolissacarídeos, e um dia após o dano tecidual já podem ser encontrados no tecido lesado (25).

Após sucesso cirúrgico inicial, pode ocorrer aumento dos níveis da PIO, e isso ocorre, principalmente graças à fibrose da episclera ou por espessamento conjuntival da região da bolha filtrante (26). Nesses casos, principalmente quando a bolha cirúrgica estiver bem delimitada e com aspecto cístico, uma opção terapêutica é a realização de agulhamento local (26).

A conjuntiva é composta por epitélio (sobre membrana basal) e lâmina própria. As células epiteliais são entremeadas de células caliciformes, encarregadas de produzir muco (27, 28). A lâmina própria apresenta uma camada superficial de tecido reticular, rica em células linfocitárias e uma camada profunda de tecido fibrilar (27). Linfócitos podem ser encontrados entre células epiteliais normais; e em condições inflamatórias, linfócitos polimorfonucleares podem aparecer (29).

Em condições normais é reduzida a expressão de moléculas HLA (Human Leukocyte Antigen) de classes I e II na maioria das células parenquimatosas do olho, diminuindo a capacidade das células T reconhecerem antígenos, pois isso é feito em conjunto com moléculas do sistema HLA. Além disso, existem no olho outros mecanismos de imunorregulação, mas quando eles falham podem ocorrer reações inflamatórias auto-imunes (30). Por exemplo, em consequência da rica vascularização (ramos das artérias ciliares anteriores e da artéria oftálmica), as doenças inflamatórias de caráter imunológico são frequentes no epitélio conjuntival.

A resposta imuno específica da superfície ocular ao uso crônico de medicamentos e a outros agressores é precedida pela aparição de linfócitos

segregados desde o epitélio conjuntival. Esses linfócitos detectam antígenos estranhos e iniciam o mecanismo de defesa com a produção de imunoglobulinas, mecanismo esse que é possível pela presença de mediadores químicos armazenados como aminas vasoativas nos grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas, ou como enzimas proteolíticas nos lisossomas de macrófagos e neutrófilos (31).

A tarefa de apresentar os antígenos para o reconhecimento das células T é realizada por proteínas especializadas que são codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), inicialmente descrito relacionado à rejeição de transplantes. Os genes do CPH em humanos são chamados de sistema HLA. Esses genes são divididos em três áreas (chamadas de I, II e III) do braço curto do cromossomo 6 (32).

As moléculas codificadas pelos genes do CPH são glicoproteínas que apresentam três porções: a) extracelular, responsável por apresentar os antígenos às células T; b) intracelular (citossólica), que participa da transdução de sinais intracelulares; c) transmembrana, que mantém a molécula “presa” na membrana celular (32).

As moléculas da classe I têm um papel importante ao apresentarem peptídeos virais e endógenos às células T CD8⁺, enquanto as moléculas da classe II apresentam peptídeos às células CD4⁺. A região de classe III contém genes que codificam alguns componentes do sistema do complemento, genes para as enzimas 21-hidroxilase (21B, 21A), a proteína do choque térmico 70 (Hsp 70) e os fatores de necrose tumoral TNF- α e β (32).

Sherwood et al. (1989) analisaram biópsias conjuntivais colhidas de dois grupos de pacientes com glaucoma: um grupo que sofreu indicação precoce de cirurgia fistulizante, e outro que usou pelo menos dois tipos de medicamentos tópicos por, no mínimo, 12 meses. O grupo que fez uso de medicação tópica por mais tempo apresentou na conjuntiva e na cápsula de Tenon maior número de diversos tipos celulares relacionados com a inflamação, como macrófagos, fibroblastos, linfócitos, além de reduzido número de células calciformes. Eles

também sugeriram que essa elevada resposta inflamatória poderia comprometer os resultados cirúrgicos (33).

Broadway et al. (1994) verificaram resultado semelhante em biópsias conjuntivais de um grupo de pacientes com glaucoma que fazia uso de uma combinação de beta-bloqueadores, mióticos e simpatomiméticos. Esse resultado não foi verificado no grupo de pacientes que usavam somente beta-bloqueadores, ou que fizeram uso de uma medicação tópica (miótico ou beta-bloqueador) por um curto período de tempo (menos de seis semanas) (34).

Os mesmos pesquisadores compararam esses grupos em relação ao sucesso cirúrgico, e os pacientes que fizeram uso da combinação dos três medicamentos acima apresentaram resultado cirúrgico pior que os demais (35). Ambos os estudos foram realizados antes do advento dos análogos de prostaglandina como medicação no tratamento do glaucoma.

Por esse motivo, Broadway et al. (2001) sugeriram que sempre fossem realizados testes não invasivos de citologia conjuntival no pré-operatório de cirurgias fistulizantes, com a finalidade de ser verificado o risco de falha cirúrgica que o paciente apresenta (36).

Lavin et al. (1990) compararam os resultados cirúrgicos de um grupo que se submeteu à trabeculectomia como tratamento primário (uso de medicação antiglaucomatosa por, no máximo, dois meses) com outro grupo que recebeu medicação tópica por um ano, seguido de trabeculectomia. O grupo que recebeu a medicação por mais tempo obteve menor redução da PIO (37).

O exame na lâmpada de fenda nem sempre é totalmente preciso para avaliarmos se a conjuntiva está inflamada ou não, pois em alguns casos, o oftalmologista visualiza a conjuntiva bulbar “branca”, mas existe inflamação subclínica (38).

Essa reação inflamatória da conjuntiva, que embora possa ser subclínica, pode ser detectada pela presença de marcadores da inflamação na superfície ocular, como o HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-DR), molécula da classe II do CPH (39, 40). A presença do HLA-DR nos tecidos conjuntival e

subconjuntival, indicando inflamação crônica, já tinha sido relatado por Nuzzi et al. (1995) e Baudouin et al. (1994) (23, 41) em pacientes em tratamento tópico com drogas anti-glaucomatosas, mesmo antes do advento dos análogos de prostaglandina. Rodrigues et al. (2009), estudando a expressão de HLA-DR conjuntival por meio de citologia de impressão, relataram atividade inflamatória aumentada em indivíduos que faziam uso de análogos de prostaglandina tópicos quando comparados com controles saudáveis (42).

Guenon et al. (2005) estudaram, *in vitro*, o efeito em células conjuntivais dos análogos de prostaglandina disponíveis no mercado (Latanoprost, Travoprost e Bimatoprost), além de seu conservante (Cloreto de Benzalcônio). A citotoxicidade encontrada no estudo foi proporcional à concentração de Cloreto de Benzalcônio. Dentre os três análogos de prostaglandina, o que demonstrou menor efeito citotóxico foi o Bimatoprost, e este é o medicamento que apresenta menor concentração de Cloreto de Benzalcônio em sua formulação (43). Pisella et al. (2004) também atribuíram, principalmente ao cloreto de benzalcônio, a maior parcela de “culpa” na inflamação conjuntival de pacientes que fazem uso de medicações antiglaucomatosas tópicas (44).

Baudouin et al. (2002), estudando a inflamação conjuntival por meio da porcentagem de células expressando HLA-DR e de outros parâmetros, comprovaram o efeito benéfico da utilização de agentes anti-inflamatórios tópicos na redução da inflamação subclínica, mesmo com a continuidade da medicação anti-glaucomatosa. O estudo demonstrou que, tanto a indometacina (anti-inflamatório não esteroideal) livre de conservantes quanto à fluometolona (anti-inflamatório esteroideal) apresentaram melhora na inflamação conjuntival subclínica, reduzindo a porcentagem de células que expressavam HLA-DR (24). Os autores não chegaram a avaliar se essa melhora da inflamação subclínica altera os resultados de cirurgias antiglaucomatosas.

No que diz respeito ao tratamento cirúrgico, Ihan e Cvenkel (2000), utilizando citologia de impressão na conjuntiva bulbar, encontraram expressão de HLA-DR em células do epitélio conjuntival até seis meses depois de

cirurgias filtrantes (45). Isso indica aumento da habilidade das células epiteliais de induzirem inflamação imuno-mediada, com subsequente fibrose. Porém, os mesmos autores não detectaram diferenças significativas na expressão de HLA-DR no grupo com falha cirúrgica em relação ao grupo que obteve sucesso no controle pressórico após trabeculectomia. Já Souchier et al. (2006) encontraram expressão menor de HLA-DR no epitélio conjuntival dos pacientes que obtiveram sucesso cirúrgico (46). Porém, a diferença de metodologia, inclusive a diferença de critérios na classificação de sucesso cirúrgico dificulta a comparação entre os estudos.

Como as drogas usadas no tratamento de glaucoma, potencialmente causam inflamação conjuntival (mesmo que subclínica), é necessário verificar se essa inflamação afeta os resultados cirúrgicos da trabeculectomia, já que parte dos pacientes tratados clinicamente passa a ter indicação cirúrgica quando não há controle pressórico adequado. É importante verificar se é recomendável a suspensão de medicações antiglaucomatosas tópicas no período pré-operatório, assim como a introdução de corticóides, ou mesmo a indicação precoce de trabeculectomia.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é verificar se a presença de inflamação conjuntival em pacientes portadores de glaucoma no momento da cirurgia está associada à falência da trabeculectomia.

3. PACIENTES E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (Anexo 1).

Foram selecionados pacientes portadores de glaucoma atendidos no Ambulatório de Oftalmologia do HCFMRP-USP. Foram incluídos no estudo 32 pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto, diagnosticado segundo critérios da Sociedade Brasileira de Glaucoma (21), com indicação cirúrgica para trabeculectomia, que informados dos objetivos e métodos da pesquisa, concordaram em participar da mesma e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). Todos esses pacientes foram submetidos à cirurgia e colheita de biópsia conjuntival, totalizando 40 olhos operados.

Quatro biópsias colhidas foram removidas do estudo, pois os pacientes abandonaram o seguimento antes de completarem seis meses de pós-operatório. Além disso, uma biópsia foi extraviada, e em outra, o material colhido foi insuficiente para ser analisado.

Assim, o grupo de estudo foi composto por 34 olhos, de 28 pacientes, sendo que 20 pacientes eram do sexo masculino (71,42%) e oito do sexo feminino (28,57%). O intervalo das idades variou de 50 a 76 anos, o que pode ser observado na Figura 1.

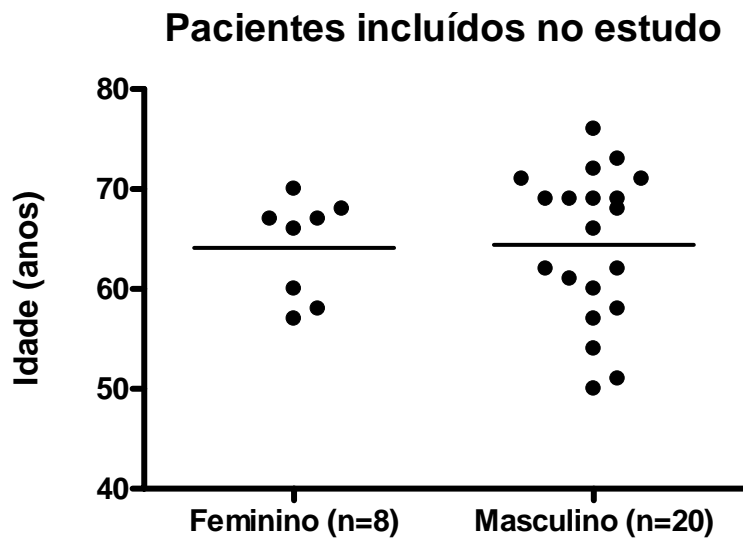


Figura 1: Distribuição dos participantes incluídos no estudo segundo o sexo e a idade (n=28).

Os pacientes foram numerados de 1 a 28, evitando-se assim a identificação direta dos participantes do estudo. Quando mais de um olho do mesmo paciente foi incluído no estudo, foi especificado olho direito (OD) ou olho esquerdo (OE).

Entre todos os pacientes participantes do estudo, vinte e dois (totalizando 27 olhos estudados) fizeram o acompanhamento pós-operatório por 24 meses após a cirurgia antiglaucomatosa.

Foram excluídos do estudo:

- 1) Pacientes com pterígio, expressão aberrante de HLA-DR e de outros marcadores, detectada por imunohistoquímica (47);
- 2) Pacientes menores de 50 e maiores de 80 anos;
- 3) Pacientes que sofreram qualquer tipo de cirurgia ocular prévia no olho a ser estudado.

As indicações para trabeculectomia foram as seguintes (1, 2):

- Olhos com evidência comprovada de progressão do dano glaucomatoso na vigência de medicação máxima tolerada;

- Olhos com PIO significativamente superior à pressão alvo na vigência de medicação antiglaucomatosa máxima tolerada;
- Paciente sem condições de manter o tratamento medicamentoso (baixa aderência ao tratamento medicamentoso por qualquer motivo).

Dos pacientes que abandonaram o seguimento antes dos seis meses de pós-operatório, dois eram do sexo masculino e um do sexo feminino. A idade desses pacientes era: 61 anos (sexo feminino), 65 e 68 anos (sexo masculino).

3.1. Técnica cirúrgica

Todos os pacientes foram submetidos à anestesia pela técnica de bloqueio peribulbar, com agulha de 22 gauge (Embramac, São Paulo, SP, Brasil). Foram utilizados os anestésicos Bupivacaína 0,5% (Cristália, São Paulo, SP, Brasil) e Lidocaína 2% (Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brasil), na diluição 1:1, no total de 8 ml (4 ml no quadrante medial superior e 4 ml no quadrante inferior temporal), imediatamente antes do ato operatório (48). Em pacientes com tonometria pré-operatória acima de 35 mmHg foi administrado Manitol 20% 250 ml endovenoso com pinça aberta, uma hora antes da cirurgia, para evitarmos descompressão súbita do globo ocular (21).

Após assepsia adequada, os pacientes foram submetidos à trabeculectomia superior (18) com flap conjuntival base fórnice, sempre pela mesma equipe médica. Após abertura conjuntival cuidadosa, foi realizada cauterização de vasos episclerais, seguida de elaboração de flap escleral triangular de 5 mm em seu maior comprimento, e metade da espessura escleral. Uma paracentese de câmara anterior foi realizada com agulha de 30 gauge, com a intenção de evitarmos a descompressão súbita no momento da esclerotomia. A esclerotomia foi realizada sempre com *punch* convencional, seguida de iridectomia feita com tesoura de Vannas. A sutura do flap escleral foi realizada com fio nylon 10-0 Ethicon® (Johnson & Johnson, Sommerville, NJ, Estados Unidos da América), utilizando-se a técnica de sutura removível (Figura 2) (49). Foi dado um laço no vértice do triângulo formado pelo flap

escleral e pela esclera fixa (sem atar o nó). A sutura escleral foi ajustada para mantermos a tensão ocular desejada, na tentativa de evitar-se hipertonia ou câmara rasa no pós-operatório imediato. A extremidade inferior do fio foi deixada sempre sepultada no estroma corneano, para evitarmos desepitelizações corneanas e facilitar sua remoção. A sutura conjuntival foi realizada com fio vycril 8-0 Ethicon® (Johnson & Johnson, Sommerville, NJ, Estados Unidos da América). A conjuntiva foi suturada em pelo menos dois pontos, um em cada extremidade da incisão. Pontos adicionais foram dados, caso fosse verificado vazamento da ferida cirúrgica. Após a realização dos pontos, a fístula foi testada através da injeção de quantidade mínima (menor que 1ml) de *balanced saline solution* (BSS) pela paracentese de câmara anterior. A formação de uma bolha subconjuntival foi interpretada como presença de fistula cirúrgica pérvia.

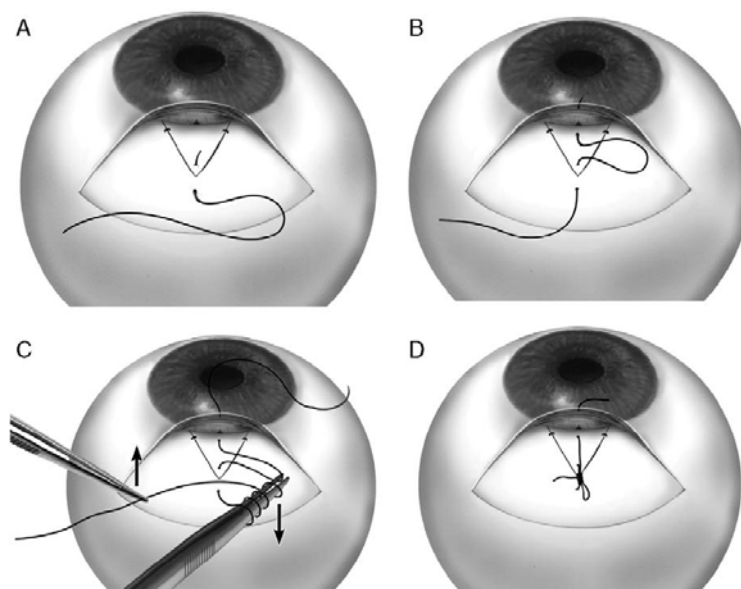


Figura 2: Técnica de sutura removível utilizada no estudo. Ilustrações feitas por Juliette Watts. (Fonte: Barros et al., 2008).

Em nenhum dos casos foram utilizados antimetabólitos no intra-operatório, senão seria uma variável a mais a ser estudada e diminuiria o

número de pacientes por grupo. Pacientes que foram submetidos a cirurgias oculares prévias e os com menos de 50 anos receberam indicação de antimetabólitos no intra-operatório e não foram incluídos no trabalho.

Os pacientes submetidos ao estudo continuaram o tratamento clínico máximo tolerável até o dia da cirurgia. No momento do ato cirúrgico foi colhido um retalho da conjuntiva bulbar inferior (na posição de 6 horas do relógio) de 5 X 5 mm, que foi fixado em formol e enviado para elaboração de lâminas para reação imunohistoquímica e de HE. Optou-se por não serem colhidas amostras de conjuntiva bulbar superior para que isso não interferisse no ato cirúrgico e seus resultados. Além disso, em estudos usando citologia de impressão, foram colhidas células da conjuntiva bulbar inferior com resultados satisfatórios (42, 50).

3.2. Pós-operatório

Os pacientes submetidos à cirurgia foram avaliados sempre pela mesma equipe médica (autor, residentes de terceiro ano, orientadora) no ambulatório de pacientes cirúrgicos do Setor de Glaucoma do HCFMRP-USP.

As medicações tópicas prescritas no pós-operatório foram:

- 1) Atropina 1% (Allergan, São Paulo, SP, Brasil), uma gota de 12 em 12 horas, por 15 dias;
- 2) Maxidex® (Dexametasona 0,1%, Alcon Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil), na posologia de uma gota de três em três horas por 15 dias, após redução gradual até completar tratamento por, pelo menos, um mês.

Para a profilaxia de infecções, foi utilizado um dos seguintes colírios antibióticos:

- 1) Tobrex® (Tobramicina 0,3%, Alcon Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil), Oflox® (Ofloxacin 0,3%, Alcon Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) ou Vigamox® (Moxifloxacin 0,5%, Alcon Laboratórios, São

Paulo, SP, Brasil), na posologia de uma gota quatro vezes ao dia, por, pelo menos, uma semana.

Os pacientes foram examinados no pós-operatório imediato, e semanalmente até completarem 30 dias da data de cirurgia. Após, foram agendados retornos quinzenais até o 60º dia pós-operatório, retorno ao 90º pós-operatório, retornos trimestrais até completarem um ano de pós-operatório, e semestrais até completarem dois anos. Retornos em prazos mais curtos foram marcados na vigência de hipotonia, hipertonia, ou qualquer outra complicação pós-operatória.

Todos os pacientes tiveram suas suturas do flap escleral removidas até três semanas de pós-operatório. Os pacientes foram seguidos por um período de 24 meses e separados em grupos, de acordo com o resultado cirúrgico aos seis e 24 meses de pós-operatório.

Em todas as consultas no pós-operatório foi realizada tonometria com tonômetro de aplanção de Goldmann, além de avaliação da córnea, bolha filtrante, câmara anterior e sutura cirúrgica.

Os pacientes que apresentaram sinais de encistamento da bolha filtrante e aumento da PIO acima de 20 mmHg após uma semana de seguimento pós-operatório sofreram agulhamento da bolha filtrante com agulha 30 *gauge* e subsequente injeção subconjuntival de 1 ml de solução contendo 5-fluoruracil (5-FU) a 25 mg/ml, na conjuntiva bulbar medial ou inferior, após anestesia tópica com Anestalcon® colírio (Proximetacaína, Alcon Laboratórios, São Paulo, São Paulo, Brasil). O 5-FU é um eficiente agente antimetabólito e tem a capacidade de matar células em divisão, e as células participantes do processo de cicatrização se dividem rapidamente (51).

O objetivo do agulhamento é romper a fibrose subconjuntival na área da bolha criada pela cirurgia e com isso aumentar a filtração do procedimento e, conseqüentemente, diminuir o valor da PIO (26).

Pacientes que apresentavam PIO acima de 20 mmHg por dois ou mais retornos consecutivos, mesmo após serem submetidos a agulhamento da bolha filtrante e aplicação de 5-FU, receberam prescrição de medicação tópica

antiglaucomatosa. Os que apresentavam PIO acima de 20 mmHg sem melhora após agulhamento e injeção de 5-FU e tratamento medicamentoso receberam indicação de nova cirurgia antiglaucomatosa, desta vez com uso de antimetabólitos no intra-operatório.

A equipe que fez o seguimento pós-operatório não sabia do resultado das análises quantitativa e qualitativa do HLA-DR, bem como da reação de HE.

Para a análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher ou do chi-square, sendo considerados significativamente diferentes os valores de $p \leq 0,05$.

3.3. Definição de sucesso cirúrgico

Os pacientes foram divididos em grupos, de acordo com o resultado cirúrgico (52):

Grupo 1: Sucesso Total: PIO entre 6 e 20 mmHg sem uso de medicações antiglaucomatosas ou reoperação para controle da PIO durante o período pós-operatório;

Grupo 2: Sucesso Qualificado: PIO maior que 6 e menor que 20 mmHg com o uso de medicações antiglaucomatosas e/ou submetidos a agulhamento da bolha filtrante com uso de antimetabólitos no período pós-operatório;

Grupo 3: Falha Cirúrgica: reoperação (nova trabeculectomia), ou PIO acima de 20 mmHg, mesmo com uso de medicação anti-glaucomatosa e/ou submetidos a agulhamento da bolha filtrante com uso de antimetabólitos no período pós-operatório.

3.4. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas passaram por uma bateria de banhos consecutivos: três banhos de Xilol, dois de etanol 100%, um de etanol 95% e um de etanol 80%, durante cinco minutos cada. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente, colocadas em Hematoxilina de Harris por três minutos e lavadas novamente em água corrente. Em seguida, as lâminas foram colocadas em

solução saturada de bicarbonato de sódio por um minuto e novamente lavadas com água. O material foi colocado em etanol 95% por cinco minutos, e depois em Eosina (solução alcoólica) por três minutos. Após a Eosina, as lâminas foram lavadas com água corrente, desidratadas com três lavagens com etanol 100%, imersas duas vezes em xilol e montadas com Permount (Fisher Scientific, CA, USA).

3.5. Reação imunohistoquímica (HLA-DR)

Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em solução de citrato 10mM/pH6,0 e submetidos à fervura em panela a vapor durante 40 minutos, a 95°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS (*phosphate buffered saline*) e submetidas a um tratamento com banho de peróxido de hidrogênio 3%, por 20 minutos, à temperatura ambiente, para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. A seguir, para o bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com soro normal de cavalo por 30 minutos. A diluição do anticorpo foi estabelecida por meio de avaliação da positividade em lâmina sabidamente positiva com diferentes concentrações para determinação de melhor título do anticorpo anti-HLA-DR. Deste modo, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-HLA-DR na concentração 1:50 (Dako, Glostrup, Dinamarca) (53), à temperatura ambiente, *overnight* em câmara úmida. Decorrido o período de incubação, as lâminas foram submetidas à lavagem com PBS e incubadas com o reagente *Camundongo Probe* (Mach 4 Universal HRP-Kit Polímero, Biocare Medical, Concord, CA, USA), em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas três vezes em PBS e incubadas com Polímero HRP, em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. Na sequência, os cortes foram lavados em PBS, e a reação revelada com incubação dos cortes em solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente, por quatro minutos. Após a

incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente, contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 40 segundos, lavadas novamente em água corrente, desidratadas em baterias de álcool e Xilol e montadas em Permount (Fisher Scientific, CA, USA).

Para controle positivo da reação imunológica foram utilizados cortes histológicos de linfoma humano. O controle negativo para o marcador foi constituído dos mesmos cortes histológicos utilizados no controle positivo, subtraindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário e substituindo-o por PBS.

3.6. Análise qualitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR

As lâminas resultantes das biópsias de todos os pacientes presentes no estudo foram examinadas por um experiente patologista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). No ato do exame, o patologista não sabia nenhum dos dados coletados dos pacientes, tais como nome, idade, sexo, medicação tópica prévia ou resultado cirúrgico, configurando assim mascaramento simples. O patologista classificou as lâminas em:

- negativas para a marcação com o anticorpo anti-HLA-DR;
- positivas para a marcação com o anticorpo anti-HLA-DR.

A positividade ainda foi dividida em intensidade, variando de 1+/4+ para casos com poucas células marcadas a 4+/4+, e quando foi observado elevado número de células marcadas (42).

3.7. Análise quantitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR

A análise quantitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR foi realizada por um sistema de análise de imagem que inclui um microscópio trinocular Olympus BX41[®] acoplado a uma câmera colorida CCD Samsung[®] (SDC-313/243) e o programa PCTV Pinnacle Media Center[®], do Departamento

de Patologia da FMRP-USP. As imagens foram analisadas pelo programa Image J - versão 1.41o (National Institutes of Health, USA). Média de 8 a 10 campos com células marcadas foi selecionada de cada lâmina para a análise quantitativa do HLA-DR. As células foram consideradas positivas para o marcador quando houve presença de imunoprecipitado citoplasmático e/ou de membrana citoplasmática de coloração castanha.

Foi utilizado o método de contagem de células (*"cell counter method"*) (54), em que as células marcadas podem ser contadas diretamente a partir do monitor do computador, posicionando marcações de diferentes cores nas células positivas e negativas, por meio de cliques com o mouse. Ao final da contagem, todos os dados foram exportados para planilhas no programa Excel 2007[®] (Microsoft Corporation, USA), onde é disponibilizada uma somatória dos resultados da contagem de uma lâmina. Foram quantificadas pelo menos 600 células por biópsia e, em seguida, foram calculadas as porcentagens de expressão imunohistoquímica para o marcador selecionado no presente estudo.

A análise quantitativa foi realizada por uma biomédica do Setor de Patologia da FMRP-USP, com experiência em análises utilizando este tipo de marcador. Ela sabia previamente que os casos selecionados tinham o resultado positivo na análise qualitativa, mas não sabia qual era a classificação dada em cruces (de 1+/4+ a 4+/4+), e também não conhecia nenhum dado em relação à identificação do paciente ou ao resultado cirúrgico.

3.8. Análise qualitativa da reação inflamatória em biópsias coradas com HE

A intensidade do processo inflamatório foi qualificada em cruces, variando de 1+/4+ a 4+/4+, de acordo com o número de neutrófilos por campo. Esta quantificação foi feita pelo mesmo patologista que realizou a análise qualitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR.

4. RESULTADOS

4.1. Complicações cirúrgicas

A tabela abaixo mostra as complicações apresentadas pelos pacientes do presente estudo nos primeiros seis meses de pós-operatório. Os que não estão demonstrados na tabela não apresentaram complicações. Apenas um apresentou complicação intra-operatória (saída de vítreo pela incisão). Porém, este paciente não realizou seguimento por ao menos seis meses e os dados referentes a esse olho não foram incluídos na análise.

Após os seis meses iniciais de seguimento pós-operatório, três pacientes desenvolveram catarata e foram submetidos à facoemulsificação com implante de lente intra-ocular. Além disso, um dos pacientes desenvolveu endoftalmite (paciente número 12) aos oito meses de pós-operatório.

Nenhum paciente pertencente ao estudo apresentou *phthisis bulbi* ou ausência de percepção luminosa ao exame de acuidade visual.

Tabela 1. Complicações verificadas em 22 das 34 trabeculectomias. HCFMRP- 2006-2008.

Olhos	Sexo	Idade do paciente	Complicação
2 (OE)	F	58	Descolamento de coróide e Sinal de Seidel+
3	M	69	Sinal de Seidel+
5 (OE)	F	66	Sinal de Seidel+
13 (OE)	F	70	Sinal de Seidel+
14	M	71	Descolamento de coróide
15 (OD)	M	60	Bolha cística
15 (OE)	M	60	Sinal de Seidel+
6 (OE)	M	69	Bolha cística
16	M	69	Descolamento de coróide
17	M	76	Bolha cística
18	M	61	Bolha cística
19	M	71	Bolha cística
20	M	50	Bolha cística
21	M	62	Bolha cística
22(OD)	F	60	Fechamento óstio interno
22 (OE)	F	60	Bolha cística
23	F	57	Bolha cística e Sinal de Seidel+
24	M	66	Bolha cística
25	M	58	Bolha cística
26	M	54	Descolamento de coróide e bolha cística
27	M	51	Fechamento óstio interno e Sinal de Seidel+
28	M	62	Fechamento óstio interno

PIO= Pressão Intra-ocular; M= Masculino; F=Feminino; OD= olho direito; OE= olho esquerdo.

4.2. Divisão dos grupos de acordo com os resultados cirúrgicos aos seis meses de pós-operatório

Grupo 1 (Tabela 2): Sucesso total: composto por 18 olhos (15 pacientes).

A tabela abaixo mostra o grupo classificado como sucesso total aos seis meses de acompanhamento pós-operatório. Nenhum dos pacientes fez uso de medicação antiglaucomatosa no pós-operatório ou sofreu qualquer procedimento que visasse à redução da PIO. Uma paciente (número 13) foi

submetida à sutura de conjuntiva em seu olho esquerdo, pois apresentava vazamento da ferida cirúrgica (sinal de Seidel positivo) sem melhora com medidas clínicas.

Tabela 2: Olhos incluídos no Grupo 1 (sucesso total) aos seis meses de pós-operatório. HCFMRP- 2006-2007.

Olhos	Idade do paciente	Sexo	Medicação pré-operatória	PIO pré-operatória	PIO 6m
1	69	M	MT+L+D	20	10
2 (OD)	58	F	MT+L+D	40	18
2 (OE)	58	F	MT+L+D	40	18
3	69	M	B+T	20	8
4	67	F	MT+T	20	12
5 (OD)	66	F	MT+TB	22	10
5 (OE)	66	F	MT+A+T+TB	24	10
6(OD)	69	M	MT+TB	24	16
7	67	F	MT	16	12
8	73	M	MT+TB	40	10
9	72	M	X+MT+D	25	16
10	57	M	MT+TB+A+L	16	14
11	68	M	MT+T+A	28	9
12	68	F	L+CG+A	18	18
13 (OD)	70	F	MT+TB+T	20	16
13 (OE)	70	F	MT+TB+T	27	12
14	71	M	MT+TB+D+T	18	10
17	76	M	MT+TB+L	20	10

PIO= Pressão Intra-ocular; M= Masculino; F=Feminino; OD= olho direito; OE= olho esquerdo; L= Lumigan (Bimatoprost 0,03%); MT=Maleato de Timolol 0,5%; T= Travatan (travoprost 0,004%); TB= Tartarato de Brimonidina 0,2%; A= Azopt (brinzolamida 1%); B=Betaxolol 0,5%; X= Xalatan (latanoprost 0,005%); D= Cloridrato de Dorzolamida 2%.

Grupo 2 (Tabela 3): Sucesso qualificado: composto por 13 olhos (12 pacientes).

Tabela 3: Olhos incluídos no Grupo 2 (sucesso qualificado) aos seis meses de pós-operatório. HCFMRP- 2006-2007.

Olhos	Idade do paciente	Sexo	Med. pré-operatória	PIO pré-operatória	PIO 6m	Intervenção
15 (OD)	60	M	T+A	19	16	AG+5FU+Med
15 (OE)	60	M	T+A	24	18	AG+5FU+Med
6 (OE)	69	M	MT+TB	24	16	AG+5FU
16	69	M	MT+TB+T+A	20	18	Med
18	61	M	MT+TB+X	18	16	AG+5FU
19	71	M	MT+TB+X+A	16	18	Med
20	50	M	MT+TB+T+A	26	12	AG+5FU+Med
21	62	M	MT+TB+D	30	16	AG+5FU+Med
22 (OE)	60	F	MT+TB+T	22	16	AG+5FU
23	57	F	MT+TB+A	26	16	AG+5FU
24	66	M	MT+TB+L+A	20	20	AG+5FU
25	58	M	MT+TB+A+T	25	18	Med
26	54	M	MT+TB+L+D	18	8	AG+5FU

PIO= Pressão Intra-ocular; M= Masculino; F=Feminino; OD= olho direito; OE= olho esquerdo; Med= Medicação antiglaucomatosa; L= Lumigan (Bimatoprost 0,03%); MT=Maleato de Timolol 0,5%; T= Travatan (travoprost 0,004%); TB= Tartarato de Brimonidina 0,2%; 5-FU= 5-fluoruracil; A= Azopt (brinzolamida 1%); AG= Agulhamento; B=Betaxolol 0,5%; X= Xalatan (latanoprost 0,005%); D= Cloridrato de Dorzolamida 2%.

Grupo 3 (Tabela 4): Falha da trabeculectomia: composto por três olhos (3 pacientes).

Tabela 4: Olhos incluídos no Grupo 3 (falha da trabeculectomia) aos seis meses de pós-operatório. HCFMRP- 2006-2007.

Olhos	Idade do paciente	Sexo	Med. pré-operatória	PIO pré-operatória	PIO 6m	Motivo da falha
22 (OD)	60	F	MT+TB+T	24	21	PIO>20 em uso de Med
27	51	M	MT+TB+L	38	18	Reoperação
28	62	M	MT+D+T	18	10	Reoperação

PIO= Pressão Intra-ocular; M= Masculino; F=Feminino; OD= olho direito; MT=Maleato de Timolol 0,5%; T= Travatan (travoprostá 0,004%); TB= Tartarato de Brimonidina 0,2%; D= Cloridrato de Dorzolamida 2%.

Três olhos foram classificados aos seis meses de seguimento pós-operatório como falha cirúrgica. Dois pacientes foram submetidos à nova cirurgia antiglaucomatosa (pacientes 27 e 28), enquanto o outro (paciente 22-OD) aos seis meses apresentava PIO acima de 20 mmHg, mesmo em uso de medicação antiglaucomatosa. No momento da indicação cirúrgica, os pacientes que sofreram nova trabeculectomia apresentavam fechamento do óstio interno e bolha cirúrgica plana, além de PIO acima de 20 mmHg, mesmo em uso de antiglaucomatosos (paciente 28), e agulhamento e injeção subconjuntival de 5-FU (paciente 27).

4.3. Divisão dos grupos de acordo com os resultados da trabeculectomia aos 24 meses de pós-operatório

Grupo 4: (Tabela 5) Sucesso total: composto por seis olhos (4 pacientes).

A tabela 5 mostra o grupo classificado como sucesso total aos dois anos de acompanhamento pós-operatório. Nenhum deles fez uso de medicação antiglaucomatosa no pós-operatório, ou sofreu qualquer procedimento que visasse à redução da PIO.

Tabela 5: Olhos incluídos no Grupo 4 (sucesso total) aos seis meses de pós-operatório. HCFMRP- 2006-2007.

Olhos	Idade do paciente	Sexo	PIO pré-operatória	PIO 2 anos
1	69	M	20	10
3	69	M	20	10
5 (OD)	66	F	22	12
5 (OE)	66	F	24	12
13 (OD)	70	F	20	14
13 (OE)	70	F	27	14

PIO= Pressão Intra-ocular; M= Masculino; F=Feminino; OD= olho direito; OE= olho esquerdo.

Grupo 5: (Tabela 6) Sucesso qualificado: composto por 11 olhos (9 pacientes).

Tabela 6: Pacientes pertencentes ao Grupo 5 (sucesso qualificado) aos dois anos de acompanhamento pós-operatório.

Olhos	Idade do paciente	Sexo	PIO pré-operatória	PIO 2 anos	Intervenção entre 6 a 24 meses
2 (OD)	58	F	40	16	Med
2 (OE)	58	F	40	12	Med
6 (OD)	69	M	24	12	Med
9	72	M	25	12	Med
12	68	F	18	14	Med
6 (OE)	69	M	24	16	Med
17	76	M	20	13	Med + FACO
18	61	M	18	12	Med
19	71	M	16	14	Med
21	62	M	30	10	Med
26	54	M	18	9	-

PIO= Pressão Intra-ocular; M= Masculino; F=Feminino; FACO= Facoemulsificação; OD= olho direito; OE= olho esquerdo; Med= Medicação antiglaucomatosa.

Grupo 6: (Tabela 7) Falha cirúrgica: composto por 11 olhos (10 pacientes).

Tabela 7: Olhos incluídos no Grupo 6 (falha da trabeculectomia) aos 24 meses de pós-operatório. HCFMRP, 2006-2007.

Olhos	Idade do paciente	Sexo	PIO pré-operatória	PIO 2 anos	Intervenção
10	57	M	16	12	Reoperação
11	68	M	28	24	-
14	71	M	18	12	Reoperação + FACO
16	69	M	20	28	Med+ Reoperação
20	50	M	26	26	-
22 (OD)	60	F	24	24	Med+ Reoperação
22 (OE)	60	F	22	24	Med+ Reoperação +FACO
24	66	M	20	24	-
27	51	M	38	-	Reoperação
28	62	M	18	12	Reoperação
25	58	M	25	18	Reoperação

PIO= Pressão Intra-ocular; M= Masculino; F=Feminino; FACO= Facoemulsificação; OD= olho direito; OE= olho esquerdo; Med= Medicação antiglaucomatosa.

4.4. Análise das lâminas preparadas em Hematoxilina-Eosina (HE)

Entre os olhos dos pacientes seguidos por seis meses de pós-operatório (n=34 olhos), nove apresentavam reação inflamatória (Figuras 3 e 4) verificada pela análise de HE (26,47%).

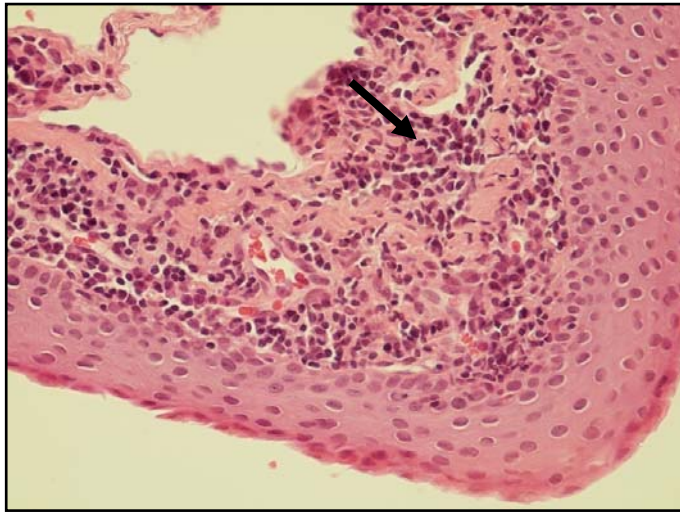


Figura 3: Lâmina corada com HE evidenciando reação inflamatória (seta). Aumento de 400x. Espessura de 5 μ m.

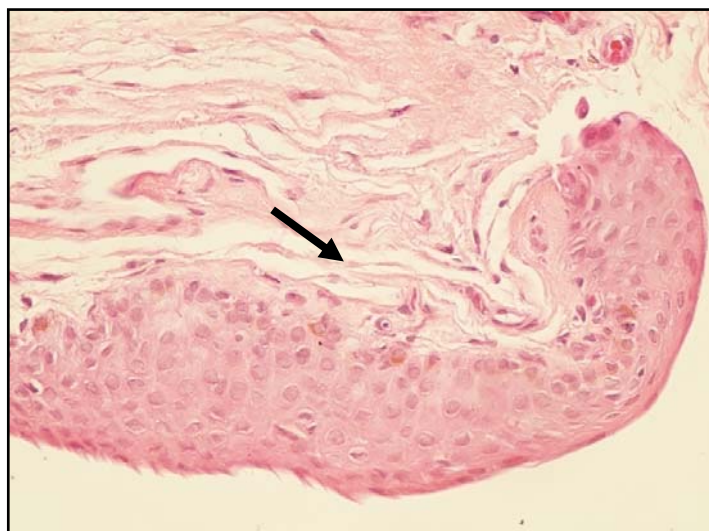


Figura 4: Ausência de reação inflamatória em lâmina corada com HE (seta). Aumento de 400x. Espessura de 5 μ m.

No grupo seguido por 24 meses (n=28 olhos), foi verificado que os mesmos nove olhos (32,14%) apresentavam células inflamatórias (Tabela 8).

Tabela 8: Reação inflamatória verificada em lâminas coradas com HE.

Olhos	HE	Grupo aos seis	
		meses	Grupo aos 24 meses
3	Inflamação	ST	ST
12	Inflamação	ST	SP
13 (OD)	Inflamação	ST	ST
20	Inflamação	SP	Falha
22 (OD)	Inflamação	Falha	Falha
21	Inflamação	SP	SP
11	Inflamação	ST	Falha
22 (OE)	Inflamação	SP	Falha
28	Inflamação	Falha	Falha

HE= Hematoxilina-Eosina; ST= sucesso total; SP= Sucesso parcial; OD= olho direito; OE= olho esquerdo.

4.5. Análise qualitativa e quantitativa da expressão imunohistoquímica de HLA-DR

Dos 34 olhos incluídos no estudo, quinze apresentavam marcação positiva para o anticorpo anti-HLA-DR (44,11%). A Figura 5 mostra uma biópsia classificada como positiva para a marcação com o anticorpo anti-HLA-DR, enquanto a Figura 6 é um exemplo de uma biópsia considerada sem marcação para o mesmo anticorpo. A tabela abaixo mostra os olhos dos pacientes que apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-HLA-DR (métodos qualitativo e quantitativo), além do grupo em que eles foram incluídos aos seis e 24 meses de pós-operatório. Os que não constam na tabela apresentaram marcação negativa para o anticorpo (Tabela 9). A Figura 7 mostra como foi feita a contagem de células para a análise quantitativa.

Tabela 9: Análise qualitativa e quantitativa da expressão de HLA-DR.

Olhos	HLA-DR+	Células marcadas (%)	Grupo aos 6 meses	Grupo aos 24 meses
1	+/4+	33,94	ST	ST
2 (OD)	+/4+	15,49	ST	SP
3	+/4+	21,90	ST	ST
4	+/4+	18,30	ST	*
5 (OE)	+/4+	16,25	ST	ST
8	+/4+	20,71	ST	*
12	+/4+	48,09	ST	SP
13 (OD)	+/4+	31,55	ST	ST
17	+/4+	15,58	ST	SP
15(OE)	+/4+	42,79	SP	*
16	2+/4+	22,01	SP	Falha
20	+/4+	23,67	SP	Falha
23	+/4+	28,00	SP	*
22 (OD)	2+/4+	22,57	Falha	Falha
27	+/4+	47,33	Falha	Falha

* = abandono de seguimento antes dos 24 meses de pós-operatório.

HLA-DR+ = Marcação positiva para o anticorpo anti-HLA-DR; ST= sucesso total; SP= Sucesso parcial; OD= olho direito; OE= olho esquerdo.

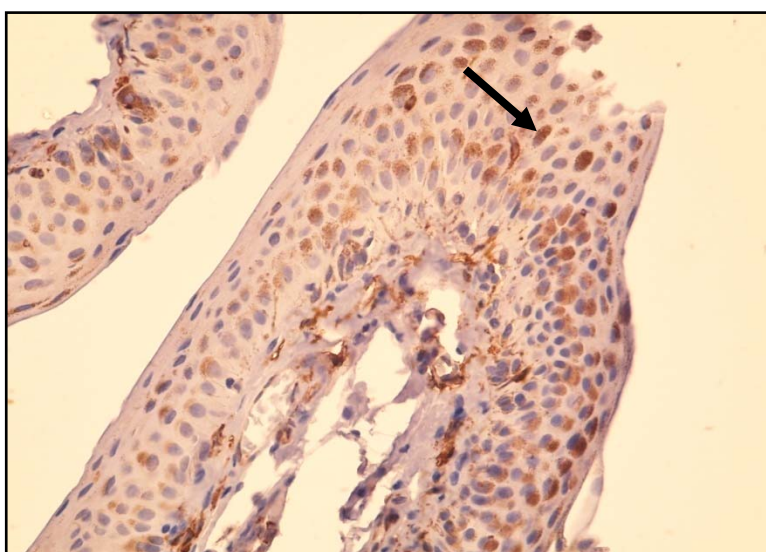


Figura 5: Epitélio conjuntival apresentando marcação para o anticorpo anti-HLA-DR (seta). Aumento de 400x. Espessura de 5µm.

Dentre os pacientes que fizeram o seguimento por 24 meses (n=27 olhos), dez olhos de dez pacientes diferentes apresentavam marcação positiva para o anticorpo anti-HLA-DR. O paciente 27 não foi seguido por 24 meses, mas como foi submetido à nova trabeculectomia aos dois meses de seguimento pós-operatório, ele foi incluído no grupo “falha”, também aos 24 meses de seguimento. Assim, temos um total de 28 olhos aos 24 meses de seguimento, sendo que onze apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-HLA-DR (39,28%).

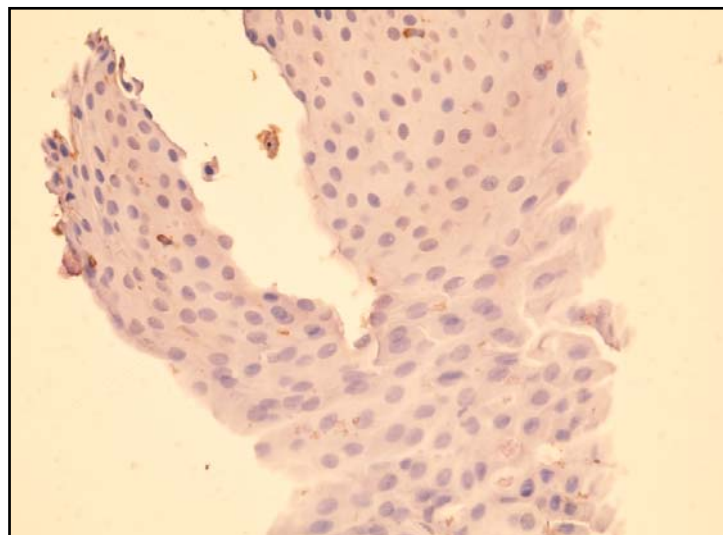


Figura 6: Epitélio conjuntival apresentando ausência de marcação para o anticorpo anti-HLA-DR. Aumento de 400x. Espessura de 5 μ m.

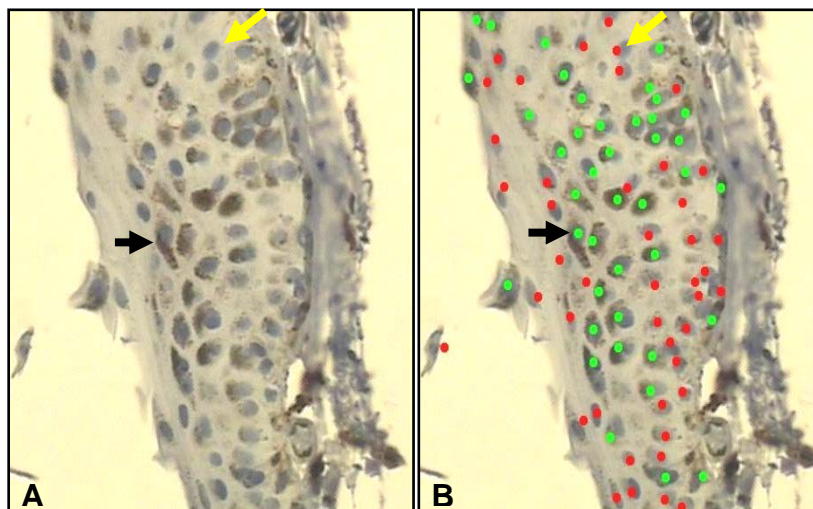


Figura 7: Contagem de células positivas e negativas para a análise quantitativa. **(A)** fragmento da biópsia conjuntival; **(B)** o mesmo fragmento no momento da contagem das células positivas e negativas para o anticorpo anti-HLA-DR. As células positivas estão representadas em verde (seta preta), e as negativas em vermelho (seta amarela). Aumento de 400x. Espessura de 5 μ m.

4.6. Análise do sucesso cirúrgico e reação inflamatória conjuntival para seis meses de seguimento pós-operatório

Como não foi verificada diferença estatística entre os grupos “sucesso total” e “sucesso parcial” nas variáveis em questão (inflamação por qualquer um dos métodos: $p=0.7224$; marcação para o anticorpo anti-HLA-DR: $p=0.7168$; inflamação nas lâminas coradas com HE: $p=1.0000$), reuniremos estes dois subgrupos em um grupo chamado “sucesso” (sucesso total e sucesso qualificado).

A) Considerando qualquer tipo de sinal inflamatório (marcação para o anticorpo anti-HLA-DR ou presença de sinais inflamatórios nas lâminas coradas com HE)

A comparação entre os grupos “sucesso” e “insucesso” ($n=3$) em relação à presença de sinais de inflamação em qualquer um dos métodos utilizado não resultou em diferença estatisticamente significativa ($p=0.2380$).

B) Considerando apenas a marcação para o anticorpo anti-HLA-DR

Considerando apenas a marcação para o anticorpo anti-HLA-DR, também não foram observadas diferenças significativas quando comparados os grupos “sucesso” e “insucesso” ($p=0.5714$).

C) Considerando apenas a verificação de células inflamatórias nas lâminas coradas com HE

O grupo “sucesso cirúrgico” ($n=31$) em comparação com o grupo “falha cirúrgica” ($n=3$) não apresentou diferença estatística em relação à presença de células inflamatórias nas lâminas coradas com HE ($p=0.1644$).

4.7. Análise do sucesso cirúrgico e reação inflamatória conjuntival para 24 meses de seguimento pós-operatório

Aos 24 meses de seguimento pós-operatório, mesmo com a diminuição do número de olhos seguidos e do aumento de casos de falha cirúrgica, de acordo com a classificação já descrita, não verificamos qualquer diferença significativa quando dividimos os pacientes em três grupos (sucesso total, parcial e falha) ou em dois grupos (sucesso e falha). Por isso, as análises abaixo foram realizadas dividindo os pacientes em “sucesso” e “falha cirúrgica”.

A) Considerando qualquer tipo de sinal inflamatório (marcação para o anticorpo anti-HLA-DR ou presença de células inflamatórias nas lâminas coradas com HE)

A comparação entre os grupos “sucesso” ($n=17$) e “insucesso” ($n=11$) em relação à presença de sinais de inflamação em qualquer um dos métodos utilizados (HLA-DR ou HE) não apresentou diferença estatística ($p=0.7047$).

B) Considerando apenas a marcação para o anticorpo anti-HLA-DR

A comparação entre os grupos “sucesso” ($n=17$) e “insucesso” ($n=11$) em relação à presença de marcação para o anticorpo anti-HLA-DR não demonstrou diferença estatística ($p=1.0000$).

C) Considerando apenas a verificação de células inflamatórias nas lâminas coradas com HE

A comparação entre os grupos “sucesso” (n=17) e “insucesso” (n=11) em relação à presença de células inflamatórias nas lâminas coradas com HE novamente não demonstrou diferença estatística (p=0.5000).

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com pacientes portadores de glaucoma de ângulo aberto que necessitavam de tratamento cirúrgico. Apesar disso, quatro pacientes não compareceram a todos os retornos marcados. Um deles, no entanto, não foi excluído do estudo por ter sido submetido à nova trabeculectomia com dois meses de seguimento pós-operatório, sendo incluído no grupo “insucesso cirúrgico”. Vale ressaltar que esses pacientes continuaram tendo o direito de serem atendidos no HCFMRP-USP, e por isso um deles pode ser reavaliado dois anos após a cirurgia.

A intenção inicial do trabalho era fazer o seguimento dos pacientes por seis meses. Mas após a verificação do fato de que alguns pacientes, anteriormente classificados no grupo “sucesso cirúrgico” ou “sucesso parcial”, apresentavam piora quando eram seguidos por um período maior de tempo, a duração do seguimento foi estendida até 24 meses após a cirurgia.

Em relação ao pós-operatório, sempre foram prescritos corticóides tópicos, pois há evidências de que o uso desses medicamentos nesse período aumenta o sucesso da cirurgia fistulizante (55).

No presente trabalho foi encontrada expressão de HLA-DR bem menor do que a apresentada no trabalho de Rodrigues et al. (42), que estudaram a expressão de HLA-DR utilizando o método de citologia de impressão em pacientes em tratamento clínico (com análogos de prostaglandina).

A indicação cirúrgica propiciou a vantagem de tornar a biópsia um procedimento ético. Esse método fornece maior número de células para a análise, porém seria contra-indicado em pacientes saudáveis ou que não apresentassem necessidade de cirurgia, quando é recomendado utilizar a citologia de impressão de conjuntiva, procedimento rápido e indolor.

Uma porcentagem maior de pacientes apresentou marcação positiva para o anticorpo anti-HLA-DR do que reação inflamatória observada nas lâminas coradas com HE (44.11% versus 26.47%). Esse fato poderia sugerir maior sensibilidade do método imunohistoquímico sobre o último método. No

entanto, seria necessário tamanho amostral maior para comprovar essa diferença de sensibilidade, pois no atual trabalho essa diferença não foi estatisticamente significativa.

O presente estudo não demonstrou correlação entre a expressão de HLA-DR conjuntival ou sinais inflamatórios verificados pela HE e o resultado cirúrgico de trabeculectomia.

Esses achados estão em concordância com os de Ihan e Cvenkel, que também estudaram expressão conjuntival de HLA-DR entre os pacientes que obtiveram sucesso cirúrgico e os que obtiveram falha (45). Segundo os autores, a baixa porcentagem de falhas cirúrgicas (13,3%) poderia explicar esse resultado. Porém, eles seguiram os pacientes por seis meses apenas. Nesse mesmo período, o presente estudo também apresentou baixa porcentagem de falha cirúrgica (8,82%), mas ao final de 24 meses, 39,28% das cirurgias apresentavam falha do procedimento, de acordo com os critérios já definidos anteriormente.

Por outro lado, Souchier et al. descreveram em seu estudo que os pacientes que obtiveram sucesso cirúrgico apresentavam menor expressão de HLA-DR no epitélio conjuntival, por meio da técnica de citologia de impressão (46).

Uma forte correlação entre a inflamação subclínica e a falência da cirurgia falaria a favor da idéia de indicação precoce de trabeculectomia em pacientes portadores de glaucoma. Porém, o presente estudo demonstrou que o tratamento medicamentoso pode seguramente ser a primeira escolha no controle da doença, e ser mantido até o momento da cirurgia, quando esta for indicada.

Não se pretendeu avaliar possível correlação entre o uso ou não de colírios antiglaucomatosos no pré-operatório e o resultado cirúrgico, já que em nenhum dos pacientes a trabeculectomia foi o primeiro tratamento para o controle da PIO. Tradicionalmente opta-se sempre por iniciar medicação antiglaucomatosa, por ser uma medida menos invasiva e com menores riscos que um procedimento cirúrgico. Apesar disso, em países em desenvolvimento,

a trabeculectomia precoce é uma abordagem, muitas vezes adotada, devido à escassez de recursos financeiros (56).

Os pacientes que apresentaram vazamento da ferida cirúrgica (sinal de seidel positivo) foram acompanhados com retornos mais curtos que o habitual, até completa resolução. Nenhum deles apresentou toque do cristalino no endotélio corneano. Os pacientes que não apresentaram melhora desse vazamento até 10 dias de pós-operatório foram submetidos à ressutura conjuntival.

O sinal de Seidel positivo não apresentou uma correlação com pior resultado cirúrgico ($p=0.1914$). Este achado está de acordo com Henderson et al., que em seu trabalho obtiveram vazamento da ferida cirúrgica em 65% dos pacientes submetidos à trabeculectomia com flap conjuntival base fórnice, e esse vazamento não resultou em piora dos resultados cirúrgicos (57).

Os pacientes que apresentaram catarata foram submetidos à facoemulsificação com implante de lente intra-ocular. Este procedimento, por si só, não foi utilizado como critério para incluir estes pacientes no grupo que obteve falha cirúrgica.

Todos os pacientes que apresentaram descolamento de coróide melhoraram com medidas clínicas (ingestão hídrica, repouso, prednisona via oral 40 mg por dia), e por isso não necessitaram de qualquer intervenção cirúrgica para corrigir essa complicação.

Um dos pacientes (número 12) desenvolveu blebite seguida de endoftalmite oito meses após a cirurgia fistulizante. Ele obteve melhora do quadro após medidas clínicas, não sendo necessário nenhum procedimento cirúrgico para o tratamento. A endoftalmite é mais comum quando o procedimento é associado ao uso de Mitomicina no intra-operatório (58), e pode ocorrer anos após o procedimento filtrante (17).

Na literatura existe grande variedade de definições de sucesso cirúrgico. Algumas delas consideram apenas o valor absoluto da PIO para definir o sucesso. Outras usam também a porcentagem de redução da PIO em relação aos valores basais. Outras divergências encontradas entre trabalhos são a

permissão ou não para uso de medicações antiglaucomatosas no pós-operatório, a inclusão de acuidade visual e campo visual, e a permissão para a realização de procedimentos invasivos (como por exemplo, agulhamento, injeção subconjuntival de antimetabólito, retirada ou lise de sutura).

No Ambulatório de Glaucoma do HCFMRP-USP, parte dos pacientes já vinha utilizando uma ou várias medicações antiglaucomatosas, torna-se difícil a definição de qual era o valor basal da PIO. Por isso esse critério não foi levado em consideração no presente estudo.

Como a população brasileira é altamente miscigenada, foi difícil definir a origem étnica de cada paciente. Por isso, a raça também não foi usada como critério para indicação de antimetabólitos no ato operatório.

Em recente meta-análise foram examinados os resumos de 100 artigos de estudos longitudinais que continham procedimentos que objetivavam redução da PIO (trabeculectomia, faco-trabeculectomia, trabeculoplastia a laser, agulhamento e cirurgias não-penetrantes). Desses 100 resumos, 92 apresentavam diferentes critérios de sucesso cirúrgico (52). Nesse mesmo estudo, o autor utilizou todos os 92 critérios para classificar um grupo de 100 pacientes que já tinham sido operados por ele próprio. Desses 100 pacientes, as taxas de sucesso cirúrgico variaram de 36 a 98% após três anos de seguimento, conforme a utilização dos critérios mais ou menos restritos. Essa grande variação nos resultados mostra que é difícil a comparação entre um trabalho e outro quando o sucesso cirúrgico é analisado. Por isso, e também pela diferença de população em estudo, cirurgião e técnica cirúrgica, é difícil comparar a porcentagem de sucesso cirúrgico presente neste trabalho com os demais registros publicados na literatura.

O presente estudo demonstrou que seis meses de seguimento pós-operatório é um tempo curto para a adequada classificação de sucesso ou falha cirúrgica. Além disso, critérios como acuidade visual, progressão da escavação do nervo óptico, campimetria visual, percepção e queixas dos pacientes devem ser levadas em conta para a definição de “sucesso”, pois o objetivo do tratamento (clínico ou cirúrgico) é a estabilização da doença, e não

simplesmente a redução da PIO. Sugerimos também uma padronização desses critérios, o que facilitaria a comparação entre diferentes trabalhos.

Novos estudos com número maior de pacientes, seguidos por um período superior a dois anos, serão necessários para confirmar os achados do presente estudo. Seria interessante também continuar o seguimento dos pacientes incluídos neste estudo por um período mais prolongado, e verificar se há alguma mudança na comparação de resultados cirúrgicos entre os pacientes que apresentavam expressão de HLA-DR conjuntival e os que não expressavam este marcador inflamatório. A utilização de outros marcadores inflamatórios, além do HLA-DR, pode ser também uma abordagem útil nessa avaliação.

Apesar do pequeno tamanho amostral, os achados obtidos representam importante avanço no manejo de pacientes com glaucoma com indicação cirúrgica. Esses resultados evidenciam que não há necessidade de suspensão de medicação antiglaucomatosa tópica no pré-operatório de trabeculectomias.

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que não há correlação entre a presença do marcador HLA-DR no epitélio conjuntival e/ou a verificação de sinais inflamatórios em biópsias coradas com HE e o insucesso cirúrgico em pacientes portadores de glaucoma primário de ângulo aberto submetidos à trabeculectomia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paranhos-Junior A, Omi CA, Prata-Junior JA, editors. Sociedade Brasileira de Glaucoma: III Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. São Paulo: Best Point; 2009.
2. Mello PA, Mandá-Junior C. II Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. São Paulo: PlanMark; 2005.
3. Foster A, Gilbert C, Johnson G. Changing patterns in global blindness: 1988-2008. *Community Eye Health*, 2008, Sep; 21(67):37-9.
4. Coleman AL. Glaucoma. *Lancet*, 1999, Nov 20; 354(9192):1803-10.
5. Leske MC, Connell AM, Wu SY, Hyman LG, Schachat AP. Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol*, 1995, Jul; 113(7):918-24.
6. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol*, 2002, Oct; 120(10):1268-79.
7. Castro AN, Mesquita WA. [Noncompliance with drug therapy for glaucoma]. *Arq Bras Oftalmol*, 2008, Mar-Apr; 71(2):207-14.
8. Tombran-Tink J, Barnstable CJ, Shields MB, editors. Mechanisms of the Glaucoma- Disease Process and Therapeutic Modalities. Totowa NJ: Humana Press; 2008.
9. Toris CB, Gleason ML, Camras CB, Yablonski ME. Effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Arch Ophthalmol*, 1995, Dec; 113(12):1514-7.
10. Silver LH. Clinical efficacy and safety of brinzolamide (Azopt), a new topical carbonic anhydrase inhibitor for primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. Brinzolamide Primary Therapy Study Group. *Am J Ophthalmol*, 1998, Sep; 126(3):400-8.

-
11. The MK-507 Clinical Study Group. Long-term Glaucoma Treatment with MK-507, Dorzolamide, a Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor. *J Glaucoma*, 1995, Feb; 4(1):6-10.
 12. Wistrand PJ, Schenholm M, Lonnerholm G. Carbonic anhydrase isoenzymes CA I and CA II in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1986, Mar; 27(3):419-28.
 13. Tabet R, Stewart WC, Feldman R, Konstas AG. A review of additivity to prostaglandin analogs: fixed and unfixed combinations. *Surv Ophthalmol*, 2008, Nov; 53(Suppl. 1):S85-92.
 14. Toris CB, Gabelt BT, Kaufman PL. Update on the mechanism of action of topical prostaglandins for intra-ocular pressure reduction. *Surv Ophthalmol*, 2008, Nov; 53(Suppl. 1):S107-20.
 15. Schachtschabel U, Lindsey JD, Weinreb RN. The mechanism of action of prostaglandins on uveoscleral outflow. *Curr Opin Ophthalmol*, 2000, Apr; 11(2):112-5.
 16. Sihota R, Saxena R, Agarwal HC, Gulati V. Crossover comparison of timolol and latanoprost in chronic primary angle-closure glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 2004, Feb; 122(2):185-9.
 17. Fontana H, Nouri-Mahdavi K, Lumba J, Ralli M, Caprioli J. Trabeculectomy with mitomycin C: outcomes and risk factors for failure in phakic open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, 2006, Jun; 113(6):930-6.
 18. Cairns JE. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol*, 1968, Oct; 66(4):673-9.
 19. Mosaed S, Dustin L, Minckler DS. Comparative Outcomes between Newer and Older Surgeries for Glaucoma. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 2009, Dec; 107:127-33.
 20. Wilensky JT, Zeimer RC, Gieser DK, Kaplan BH. The effects of glaucoma filtering surgery on the variability of diurnal intra-ocular pressure. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1994, 92:377-81; discussion 81-3.

-
21. Schwartz K, Budenz D. Current management of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*, 2004, Apr; 15(2):119-26.
 22. Folgar FA, de Moraes CG, Prata TS, Teng CC, Tello C, Ritch R, et al. Glaucoma surgery decreases the rates of localized and global visual field progression. *Am J Ophthalmol*, 2010, Feb; 149(2):258-64 e2.
 23. Nuzzi R, Vercelli A, Finazzo C, Cracco C. Conjunctiva and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1995, Mar; 233(3):154-62.
 24. Baudouin C, Nordmann JP, Denis P, Creuzot-Garcher C, Allaire C, Trinquand C. Efficacy of indomethacin 0.1% and fluorometholone 0.1% on conjunctival inflammation following chronic application of antiglaucomatous drugs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2002, Nov; 240(11):929-35.
 25. Lama PJ, Fechtner RD. Antifibrotics and wound healing in glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2003 May-Jun; 48(3):314-46.
 26. Feldman RM, Tabet RR. Needle revision of filtering blebs. *J Glaucoma*, 2008, Oct-Nov; 17(7):594-600.
 27. Faria e Sousa SJ. Doenças Oculares Externas. In: Rodrigues M, editor. *Oftalmologia Clínica*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2001, p. 237-51.
 28. Jakobiec F, Iwamoto T. Ocular Adnexa: Introduction to Lids, Conjunctiva and Orbit. In: Tasman W, Jager E, editors. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1995, p. 24-5.
 29. Srivasan B, Jakobiec F, Iwamoto T. Conjunctiva. In: Tasman W, Jager E, editors. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1995, p. 5.
 30. Voltarelli JC. Mecanismos Imunológicos das Doenças Oculares. In: Rodrigues MLV, editor. *Oftalmologia Clínica*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2001, p. 459-66.

-
31. Alves MR, Kara-José N. Conjuntivite Crônica. In: Alves MR, editor. *Conjuntiva Cirúrgica*. São Paulo: Roca; 1999, p. 1-6.
 32. Donadi EA. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina, Ribeirão Preto*, 2000; 33:7-18.
 33. Sherwood MB, Grierson I, Millar L, Hitchings RA. Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology*, 1989, Mar; 96(3):327-35.
 34. Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. I. The conjunctival cell profile. *Arch Ophthalmol*, 1994, Nov; 112(11):1437-45.
 35. Broadway DC, Grierson I, O'Brien C, Hitchings RA. Adverse effects of topical antiglaucoma medication. II. The outcome of filtration surgery. *Arch Ophthalmol*, 1994, Nov; 112(11):1446-54.
 36. Broadway DC, Chang LP. Trabeculectomy, risk factors for failure and the preoperative state of the conjunctiva. *J Glaucoma*, 2001, Jun; 10(3):237-49.
 37. Lavin MJ, Wormald RP, Migdal CS, Hitchings RA. The influence of prior therapy on the success of trabeculectomy. *Arch Ophthalmol*, 1990, Nov; 108(11):1543-8.
 38. Pisella PJ. Conjunctival markers as predictable markers for preoperative glaucoma assessment. *Br J Ophthalmol*, 2006, Nov; 90(11):1335-6.
 39. Guglielminetti E, Barabino S, Monaco M, Mantero S, Rolando M. HLA-DR expression in conjunctival cells after latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2002, Feb; 18(1):1-9.
 40. Cvenkel B, Ihan A. Ocular surface changes induced by topical antiglaucoma monotherapy. *Ophthalmologica*, 2002, May-Jun; 216(3):175-9.

-
41. Baudouin C, Garcher C, Haouat N, Bron A, Gastaud P. Expression of inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. *Ophthalmology*, 1994, Mar; 101(3):454-60.
 42. Rodrigues Mde L, Felipe Crosta DP, Soares CP, Deghaide NH, Duarte R, Sakamoto FS, et al. Immunohistochemical expression of HLA-DR in the conjunctiva of patients under topical prostaglandin analogs treatment. *J Glaucoma*, 2009, Mar; 18(3):197-200.
 43. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. In vitro study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, travoprost, and bimatoprost in conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, Jul; 46(7):2444-50.
 44. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, et al. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, May; 45(5):1360-8.
 45. Ihan A, Cvenkel B. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in glaucoma patients and its influence on the outcome of filtration surgery. *Br J Ophthalmol*, 2000, Jun; 84(6):648-50.
 46. Souchier M, Buron N, Lafontaine PO, Bron AM, Baudouin C, Creuzot-Garcher C. Trefoil factor family 1, MUC5AC and human leucocyte antigen-DR expression by conjunctival cells in patients with glaucoma treated with chronic drugs: could these markers predict the success of glaucoma surgery? *Br J Ophthalmol*, 2006, Nov; 90(11):1366-9.
 47. Tsironi S, Ioachim E, Macher M, Aspiotis M, Agnantis N, Psillas K. Immunohistochemical HLA-DR antigen expression with lymphocyte subsets and proliferative activity in pterygium. *In Vivo*, 2002, Sep-Oct; 16(5):299-306.
 48. Pablo LE, Perez-Olivan S, Ferreras A, Polo V, Gomez ML, Honrubia FM. Contact versus peribulbar anaesthesia in trabeculectomy: a prospective randomized clinical study. *Acta Ophthalmol Scand*, 2003, Oct; 81(5):486-90.

-
49. de Barros DS, Gheith ME, Siam GA, Katz LJ. Releasable suture technique. *J Glaucoma*, 2008. Aug; 17(5):414-21.]
 50. Broadway DC, Grierson I, Sturmer J, Hitchings RA. Reversal of topical antiglaucoma medication effects on the conjunctiva. *Arch Ophthalmol*, 1996, Mar; 114(3):262-7.
 51. Kapasi MS, Birt CM. The efficacy of 5-fluorouracil bleb needling performed 1 year or more posttrabeculectomy: a retrospective study. *J Glaucoma*, 2009, Feb; 18(2):144-8.
 52. Rotchford AP, King AJ. Moving the goal posts definitions of success after glaucoma surgery and their effect on reported outcome. *Ophthalmology*, 2010, Jan; 117(1):18-23 e3.
 53. Auw-Haedrich C, Potsch C, Bohringer D, Mittelviefhaus H, Maier P, Reinhard T, et al. Histological and immunohistochemical characterisation of conjunctival graft vs host disease following haematopoietic stem cell transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007, Jul; 245(7):1001-7.
 54. Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer [serial online] [Letter to editor]*, 2004; 41(1):47.
 55. Starita RJ, Fellman RL, Spaeth GL, Poryzees EM, Greenidge KC, Traverso CE. Short- and long-term effects of postoperative corticosteroids on trabeculectomy. *Ophthalmology*, 1985, Jul; 92(7):938-46.
 56. Anand A, Negi S, Khokhar S, Kumar H, Gupta SK, Murthy GV, et al. Role of early trabeculectomy in primary open-angle glaucoma in the developing world. *Eye (Lond)*, 2007, Jan; 21(1):40-5.
 57. Henderson HW, Ezra E, Murdoch IE. Early postoperative trabeculectomy leakage: incidence, time course, severity, and impact on surgical outcome. *Br J Ophthalmol*, 2004, May; 88(5):626-9.
 58. Greenfield DS, Suner IJ, Miller MP, Kangas TA, Palmberg PF, Flynn HW, Jr. Endophthalmitis after filtering surgery with mitomycin. *Arch Ophthalmol*, 1996, Aug; 114(8):943-9.

8. ANEXOS

ANEXO 1

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO <i>Comitê de Ética em Pesquisa</i>	
Fone: (16) 3602-2228 / Fax: (16) 3633-1144 cep@hcrp.fmrp.usp.br www.hcrp.fmrp.usp.br		Campus Universitário - Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Ribeirão Preto, 19 de abril de 2006

Ofício nº 1068/2006
CEP/SPC

Prezada Professora:

O trabalho intitulado **“EXPRESSIONE IMUNOHISTOQUÍMICA DA MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL, HLA-DR, E MOLÉCULA CD28 NA CONJUNTIVA DE PACIENTES COM GLAUCOMA PRIMÁRIO DE ÂNGULO ABERTO EM TRATAMENTO TÓPICO COM ANÁLOGOS DAS PROSTAGLANDINAS E EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIAS ANTIGLAUCOMATOSAS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 223ª Reunião Ordinária realizada em 17/04/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 15582/2005.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª MARIA DE LOURDES VERONESE RODRIGUES
Depto. de Oftalmo, Otorrino e Cirurgia de Cabeça e Pescoço
Em mãos

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ RG n.º _____, registro no HCRP n.º _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Expressão imunohistoquímica da molécula de histocompatibilidade principal, HLA-DR, e molécula CD28 na conjuntiva de pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto submetidos a cirurgias antiglaucomatosas.**

O objetivo do trabalho é medir a inflamação causada por colírios utilizados para o tratamento do Glaucoma, e correlacionar esses dados com os resultados cirúrgicos dos pacientes que têm indicação cirúrgica.

Estou ciente de que durante a cirurgia será colhido pequeno fragmento de tecido conjuntival do olho que estiver sendo operado e que isso não trará consequências funcionais ou estéticas (isto é, no pós-operatório o meu olho terá o mesmo aspecto do de outros pacientes submetidos a cirurgias antiglaucomatosas, a coleta não irá interferir no resultado cirúrgico). Sei que posso desistir de participar do estudo a qualquer momento, e se for do meu desejo posso receber informações sobre o andamento da pesquisa.

Fui informado pelo pesquisador que meu nome e minha participação nesse estudo permanecerão sob sigilo, com completo anonimato.

Estou ciente, também, de que o fragmento retirado será examinado e se, eventualmente, no exame realizado ou nas consultas realizadas após a cirurgia for detectado algum problema que mereça tratamento eu serei atendido pela equipe responsável pela pesquisa. Caso necessário, esse tratamento será realizado no ambulatório de Glaucoma do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os resultados da pesquisa serão divulgados em revistas científicas nacionais e/ou internacionais, além de congressos científicos. Veículos de comunicação em massa poderão ter acesso aos resultados da pesquisa apenas como caráter informativo à população.

Pesquisador Chefe: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Tel.: 36022426

ASSINATURA:

DATA:

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

ROLE OF CONJUNCTIVAL INFLAMMATION, ASSESSED BY HLA-DR IMMUNOSTAINING, IN SURGICAL OUTCOME OF TRABECULECTOMIES

João M. Furtado MD ¹, Jayter S. Paula MD PhD ¹, Edson G. Soares MD PhD ², Régia C. P. Lira MSc ², Ana Maria da Rocha BSc², Neifi H. S. Dhegaide MSc,PhD ³, Eduardo M. Rocha MD PhD ¹, Eduardo A. Donadi MD PhD ³, Maria de Lourdes V. Rodrigues MD PhD ¹.

¹ Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

² Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

³ Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Meeting presentation: The material is under consideration for presentation in the “6th International Conference on the Tear Film and Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance”, to be held in Florence, Italy, 22-25 September 2010.

Research supported by CNPq (Brazilian Council of Research, Brasilia, DF, Brazil) and CAPES/PROAP (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Brasilia, DF, Brazil/Programa de Apoio à Pós-Graduação.)

Conflict of interest: No conflicting relationship exists for any author.

Running Head: CONJUNCTIVAL INFLAMMATION AND TRABECULECTOMIES OUTCOME

Correspondence to:

Profª. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues -Hospital das Clínicas, Oftalmologia - Campus USP - Zip code: 14048-900 - Ribeirão Preto – SP - BRAZIL
FAX – 55-16-36022860 - Email: mdlvrodr@fmrp.usp.br

Abstract

Purpose: This study seeks to correlate the presence of subclinical conjunctival inflammation with the surgical results of trabeculectomy. **Design:** Cross-sectional study. **Participants:** The study included 28 patients with primary open-angle glaucoma who were using topical anti-glaucoma medication and indications for trabeculectomy. **Methods:** From the 28 patients, 34 eyes with indications for fistulizing anti-glaucoma surgery were submitted to trabeculectomy. During surgery, a sample of the inferior bulbar conjunctiva was collected for immunohistochemical processing. The expression of HLA-DR and the success of trabeculectomy were analyzed 6 and 24 months after surgery. Surgical success was defined as an intraocular pressure (IOP) between 6 mmHg and 20 mmHg, in the presence or absence of anti-glaucoma medication during the postoperative period. Surgical failure was defined as an IOP higher than 20 mmHg. Data were analyzed with the Fisher's exact or chi-square test, and the level of significance was set at $p \leq 0.05$. **Main outcome measures:** The study examined the inflammatory marker HLA-DR, in biopsies of the bulbar conjunctiva, and IOP.

Results: Of the 34 eyes that underwent surgery, 15 (44.11%) were positive for the inflammatory marker HLA-DR. There was no significant association between inflammation and the surgical results at 6 or 24 months after surgery. **Conclusions:** This study demonstrates that expression of the inflammation marker HLA-DR in conjunctival cells at the time of surgery does not alter the prognosis of trabeculectomy.

Introduction

Two types of treatment, clinical and surgical, can help prevent the progression of glaucoma damage.(1) Trabeculectomy has several advantages over anti-glaucoma medication, including a lower fluctuation of intraocular pressure (IOP), (2-4) a lower cost, and a treatment protocol that does not depend on patient compliance with the correct use of the medication.(3) Since the success of surgery is based on the maintenance of the surgical fistula, any mechanism that causes increased inflammation and local scarring can theoretically increase the chance of surgical failure.(5)

Patients using topical medications for a prolonged period of time present a larger number of various cell types related to inflammation.(6) This inflammatory reaction is more intense when the patient uses multiple topical drugs. In addition, it has been reported that patients with an early indication of trabeculectomy have better surgical results than patients who use topical drugs for a long time.(7)

The bulbar conjunctiva of patients taking anti-glaucoma medications may be inflamed even in the absence of clinical signs.(8) This inflammatory reaction can be detected by the presence of inflammation markers on the ocular surface, such as HLA-DR, a class II molecule of the major histocompatibility complex.(9-13) Some of this inflammatory activity may actually be caused by benzalkonium chloride, a preservative commonly used in topical medications.(14, 15)

The use of topical corticoids or non-steroidal anti-inflammatory drugs in combination with anti-glaucoma medication may reduce the percentage of conjunctival epithelial cells that express HLA-DR.(16) In a recent study, the preoperative use of a topical corticoid (but not of non-steroidal agents) led to better trabeculectomy outcomes.(5)

Although increased local scarring can lead to surgical failure, it is not clear whether patients presenting with the conjunctival expression of HLA-DR are at a higher risk of surgical failure. While some studies have identified a relationship between increase conjunctival expression of HLA-DR and worse surgical outcomes,(17) others have used impression cytology and found that there is no correlation between this marker and intraocular pressure during the postoperative period.(18)

It is very important to develop a standardized methodology that can identify those patients at risk of surgical failure; such a method that would allow for more personalized therapy for each patient.(19)

The objective of this study was to determine whether inflammation affects the surgical outcome of trabeculectomy. To this end, it was measured inflammation in conjunctival biopsies obtained from patients using topical anti-glaucoma medication; inflammation levels were compared across groups with different surgical outcomes.

Patients and Methods

This study was approved by the local ethics committee (protocol number 15582/2005) and all participants gave their written informed consent. The study included patients with primary open-angle glaucoma and indications for surgical trabeculectomy who were seen at the Ophthalmology Outpatient Clinic of the University Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (HCFMRP).

The study group included 34 eyes from 28 patients. Participants included 20 males (71.42%) ranging in age from 50 to 76 years (mean \pm SD: 64.40 \pm 7.56 years) and eight females (28.57%) ranging in age from 57 to 70 years (mean \pm SD: 64.12 \pm 4.99 years).

Exclusion criteria included: 1) the presence of pterygium,(20) 2) an age below 50 years or above 80 years, and 3) any type of previous surgery in the studied eye.

During the 30 days preceding surgery, the number of anti-glaucoma eye drop preparations used ranged from 1 to 4 (median 3) per eye. The most frequently-used medication was 0.5% timolol maleate (30 eyes), while one of the three forms of prostaglandin analogues available in Brazil (Latanoprost, Travoprost and Bimatoprost) was used in 27 eyes.

Several criteria indicated a need for trabeculectomy.(21, 22) These include: 1) confirmed evidence of the progression of glaucoma damage in the presence of the maximum tolerated medication dose, 2) an IOP that was significantly higher than the target pressure in the presence of the maximum tolerated medication dose, and 3) low compliance with drug treatment in patients with advanced glaucoma or with progressive glaucoma damage.

After asepsis procedures and given peribulbar anesthesia, the patients underwent superior trabeculectomy(23) with a fornix-based conjunctival flap. All surgeries were performed by the same surgeon. The conjunctiva was opened and the episcleral vessels were cauterized; next, a triangular scleral flap (5 mm at its maximum length and half the thickness of the sclera) was prepared. Sclerotomy was performed with a standard punch and was followed by iridectomy. The scleral flap was sutured with nylon 10-0 Ethicon® suture (Johnson and Johnson, Somerville, NJ, USA) with the removable suture technique,(24) and the conjunctiva was sutured with vycril 8-0 Ethicon™ suture (Johnson and Johnson).

The patients included in the study continued to use the maximum tolerated dose of medication until the day of surgery. At the time of surgery, a 5 x 5 mm fragment of

the inferior bulbar conjunctiva was obtained from the 6 o'clock position; the fragment was fixed in formol and underwent histological processing.

A topical corticoid (0.1% dexamethasone administered with one drop, 4 times a day) was prescribed on the first postoperative day, and patients were instructed to use it for at least four weeks. Other medications were also prescribed, including 1% atropine (one drop twice a day for 15 days) and topical antibiotics (0.3% ofloxacin, 0.5% moxifloxacin or 0.3% tobramycin, one drop four times a day for at least seven days).

Patients were examined on the 1st, 7th, 14th, 30th, 60th and 90th postoperative days. Quarterly returns were then scheduled for one year after surgery and bi-annual returns were scheduled until the end of the second year after surgery. Returns were scheduled at shorter intervals for patients with hypotonia, hypertonia or any other postoperative complications.

The scleral flap sutures of each patient were removed up to three weeks after surgery. The patients were followed for a total of 24 months and were divided into groups according to the surgical results observed at 6 and 24 months after trabeculectomy.

Surgical success was defined as an IOP between 6 and 20 mmHg in the presence or absence of the postoperative use of anti-glaucoma medication. Surgical failure was defined as: 1) an IOP above 20 mmHg at 6 and/or 24 months after surgery even with the use of anti-glaucoma medications, 2) an additional trabeculectomy, and 3) the development of *phthisis bulbi*. Needle puncture of the surgical bleb and the subconjunctival application of 5-fluorouracil were permitted and their indication was not considered to be surgical failure.

The preparation of the slides has been previously described.(13) Slides were prepared at room temperature in a moist chamber using the primary monoclonal anti-HLA-DR antibody at a 1:50 concentration (Dako™, Glostrup, Denmark).

Histological sections of human lymphoma were used as positive controls to examine the immunologic reaction. Negative controls consisted of the same histological sections but did not include the step of incubation with the primary antibody; this antibody was replaced with PBS.

Quantitative immunohistochemical analysis of HLA-DR expression was performed by image analysis using an Olympus BX41 trinocular microscope coupled with a CCD Samsung™ color camera (SDC-313/243) and PCTV software from the Pinnacle Media Center™. The images were analyzed using the Image J software (version 1.41, National Institutes of Health, USA). Cells were considered to be positive for the marker if a brown immunoprecipitate was present in the cytoplasm and/or on the cytoplasmic membrane.

The cell counter method(25) was used to count labeled cells directly from the monitor of the computer; marks of different colors were placed on the positive and negative cells with a click of the mouse. After the count, all data were exported to Excel 2007® spreadsheets (Microsoft Corporation, USA), which provide the sum of the results of the count on one slide. At least 600 cells per biopsy were counted and the percentage of cells showing immunohistochemical expression of the selected marker was then calculated.

Both the postoperative follow-up of the patients and the analysis of the biopsies were conducted in a masked manner. Data were analyzed statistically with the Fisher exact test or the chi-square test; the level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

The figure 1 shows the division of the operated eyes according to the surgical outcome. Six patients discontinued follow-up before 24 months after surgery; the results of their operations were therefore only included at the six-month follow-up.

The figure 2 shows the surgical complications observed in the present study. No patient showed *phthisis bulbi* or an absence of light perception during the follow-up visual acuity exam.

Labeling for the anti-HLA-DR antibody (Figure 3) was present in 41.11% of the specimens. No significant differences were observed between the “success” (n=31 eyes) and “failure” (n=3 eyes) groups at six months after surgery ($P = 0.5714$). There was also no significant difference in labeling for the anti-HLA-DR antibody between the “success” (n = 17) and “failure” (n= 11) groups at the 24-month follow-up ($P = 1.00$).

Quantitative analysis of conjunctival HLA-DR expression demonstrated cell positivity ranging from 15.49 to 48.09% (median: 22.57%; mean: $27.25\% \pm 11.18\%$). There was no correlation between the percentage of labeled cells and a worse surgical outcome ($P > 1.00$) (Figure 4 and Table 1).

Discussion

This study found no correlation between the surgical results of trabeculectomy and conjunctival HLA-DR expression. These finding agrees with those of Ihan and Cvenkel,(18) who also studied the conjunctival expression of HLA-DR among patients with surgical success and failure. According to these authors, the low rate of surgical failure (13.3%) may explain this result. However, their patients were followed for only 6 months after surgery, and the present study found that the percentage of patients

presenting surgical failure increased when the postoperative follow-up period was extended to 24 months.

Souchier et al.(17) used impression cytology to show that patients with surgical success had a lower expression of HLA-DR in the conjunctival epithelium. The differences in postoperative follow-up time (6 months versus 24 months), technique for collecting material (impression cytology versus biopsy) and the definition of surgical success (IOP \leq 15 mmHg without anti-glaucoma medication versus IOP \leq 20 mmHg with or without anti-glaucoma medication) may explain the different results.

In the present study, HLA-DR expression was much lower than that reported by Rodrigues et al.,(13) who studied HDLA-DR expression using impression cytology in patients who were treated with prostaglandin analogues. A possible explanation for this discrepancy is that a biopsy provides a larger number of cells for analysis than impression cytology.

To our knowledge, the present study is the only one to use a conjunctival biopsy to determine the conjunctival expression of HLA-DR and the results of trabeculectomy. Surgical indication makes the biopsy an ethical procedure; biopsy provides a larger number of cells for analysis, but would be contraindicated for healthy patients or for patients presenting no need for surgery. For these other patients, impression cytology of the conjunctiva, a rapid and painless procedure, is recommended.

It was avoided to obtain samples of the superior bulbar conjunctiva to prevent interference with the surgery and its results. In addition, in studies using impression cytology, cells were collected from the inferior bulbar conjunctiva with satisfactory results.(13, 26)

Surgical success is defined in many different ways in the literature. In a recent meta-analysis of 100 selected abstracts concerning procedures focused on reducing IOP (i.e., trabeculectomy, phacotrabeculectomy, laser trabeculoplasty, needling, and non-penetrating surgeries), 92 different criteria of surgical success were described.(27) These various criteria, as well as differences in the study populations, surgeons and surgical techniques, make it difficult to compare surgical success across the literature.

The definition of surgical success chosen for the present study was among the definitions most frequently used in studies on trabeculectomy.(27) Patients that needed postoperative interventions (except a new trabeculectomy) were included because in HCFMRP is routinely used to remove sutures. In addition, for ethical reasons, it was not included a control group who would have received surgery without the previous use of anti-glaucoma medication. Also, no comparisons were made between patients of different races since high rates of intermixture among the Brazilian population make it difficult to divide subjects into black and white groups.

A strong correlation between subclinical inflammation and surgical failure would support the idea of an early indication of trabeculectomy in patients with glaucoma. However, in the present study, there was no correlation between conjunctival inflammation measured by the expression of HLA-DR and the surgical results of patients who underwent trabeculectomy.

References

1. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol*, 2002 Oct;120(10):1268-79.
2. Wilensky JT, Zeimer RC, Gieser DK, Kaplan BH. The effects of glaucoma filtering surgery on the variability of diurnal intraocular pressure. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1994;92:377-81; discussion 81-3.
3. Schwartz K, Budenz D. Current management of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*, 2004 Apr;15(2):119-26.
4. Medeiros FA, Pinheiro A, Moura FC, Leal BC, Susanna R, Jr. Intraocular pressure fluctuations in medical versus surgically treated glaucomatous patients. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2002 Dec;18(6):489-98.
5. Breusegem C, Spielberg L, Van Ginderdeuren R, Vandewalle E, Renier C, Van de Veire S, et al. Preoperative Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug or Steroid and Outcomes after Trabeculectomy A Randomized Controlled Trial. *Ophthalmology* Apr 10.
6. Sherwood MB, Grierson I, Millar L, Hitchings RA. Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology*, 1989 Mar;96(3):327-35.
7. Lavin MJ, Wormald RP, Migdal CS, Hitchings RA. The influence of prior therapy on the success of trabeculectomy. *Arch Ophthalmol*, 1990 Nov;108(11):1543-8.
8. Pisella PJ. Conjunctival markers as predictable markers for preoperative glaucoma assessment. *Br J Ophthalmol*, 2006 Nov;90(11):1335-6.

-
9. Nuzzi R, Vercelli A, Finazzo C, Cracco C. Conjunctiva and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1995 Mar;233(3):154-62.
 10. Guglielminetti E, Barabino S, Monaco M, Mantero S, Rolando M. HLA-DR expression in conjunctival cells after latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2002 Feb;18(1):1-9.
 11. Cvenkel B, Ihan A. Ocular surface changes induced by topical antiglaucoma monotherapy. *Ophthalmologica*, 2002 May-Jun;216(3):175-9.
 12. Baudouin C, Garcher C, Haouat N, Bron A, Gastaud P. Expression of inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. *Ophthalmology*, 1994 Mar;101(3):454-60.
 13. Rodrigues Mde L, Felipe Crosta DP, Soares CP, Deghaide NH, Duarte R, Sakamoto FS, et al. Immunohistochemical expression of HLA-DR in the conjunctiva of patients under topical prostaglandin analogs treatment. *J Glaucoma*, 2009 Mar;18(3):197-200.
 14. Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. In vitro study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, travoprost, and bimatoprost in conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005 Jul;46(7):2444-50.
 15. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, et al. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004 May;45(5):1360-8.

-
16. Baudouin C, Nordmann JP, Denis P, Creuzot-Garcher C, Allaire C, Trinquand C. Efficacy of indomethacin 0.1% and fluorometholone 0.1% on conjunctival inflammation following chronic application of antiglaucomatous drugs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2002 Nov;240(11):929-35.
 17. Souchier M, Buron N, Lafontaine PO, Bron AM, Baudouin C, Creuzot-Garcher C. Trefoil factor family 1, MUC5AC and human leucocyte antigen-DR expression by conjunctival cells in patients with glaucoma treated with chronic drugs: could these markers predict the success of glaucoma surgery? *Br J Ophthalmol*, 2006 Nov;90(11):1366-9.
 18. Ihan A, Cvenkel B. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in glaucoma patients and its influence on the outcome of filtration surgery. *Br J Ophthalmol*, 2000 Jun;84(6):648-50.
 19. Broadway DC, Chang LP. Trabeculectomy, risk factors for failure and the preoperative state of the conjunctiva. *J Glaucoma*, 2001 Jun;10(3):237-49.
 20. Tsironi S, Ioachim E, Machera M, Aspiotis M, Agnantis N, Psillas K. Immunohistochemical HLA-DR antigen expression with lymphocyte subsets and proliferative activity in pterygium. *In Vivo*, 2002 Sep-Oct;16(5):299-306.
 21. Mello PA, Mandía-Junior C. II Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. São Paulo: PlanMark; 2005.
 22. Paranhos-Junior A, Omi CA, Prata-Junior JA, editors. Sociedade Brasileira de Glaucoma: III Consenso Brasileiro de Glaucoma Primário de Ângulo Aberto. São Paulo: BestPoint; 2009.
 23. Cairns JE. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol*, 1968 Oct;66(4):673-9.

24. de Barros DS, Gheith ME, Siam GA, Katz LJ. Releasable suture technique. *J Glaucoma*, 2008 Aug;17(5):414-21.
25. Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*, 2004 Jan-Mar;41(1):47.
26. Broadway D, Hitchings R. Conjunctival damage induced by long-term topical anti-glaucoma therapy. *Acta Ophthalmol Scand*, 1996 Feb;74(1):97.
27. Rotchford AP, King AJ. Moving the goal posts definitions of success after glaucoma surgery and their effect on reported outcome. *Ophthalmology*, 2010 Jan;117(1):18-23 e3.

Figure Legends

Figure 1. Classification of the operated eyes according to the surgical result observed at 6 months (n=34) and at 24 months (n=28) of postoperative follow-up.

Figure 2. Complications detected in 23 of the 34 surgeries performed. Encystment = encystment of the filtering bleb; Seidel+ = leakage of the surgical wound; CD = choroidal detachment; CIO = Closure of the internal ostium.

Figure 3. A: Conjunctival biopsy showing positive labeling for the anti-HLA-DR antibody (arrow). **B:** Negative labeling for the same antibody (arrow). Magnification: 400x.

Figure 4. HLA-DR quantitative analysis. **A:** conjunctival specimen; **B.** the same specimen with positive cells marked in green (black arrow) and negative cells marked in red (yellow arrow). Magnification: 400x.

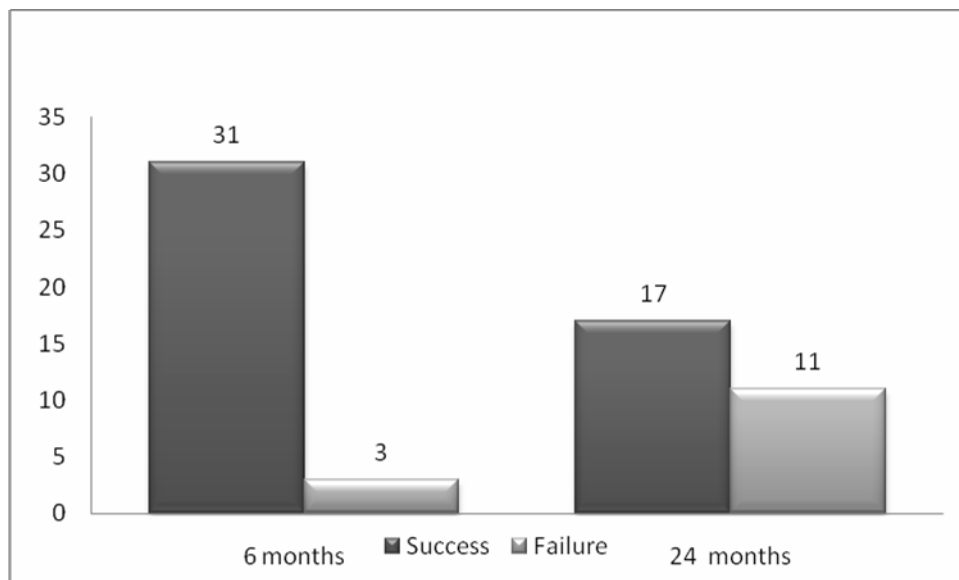
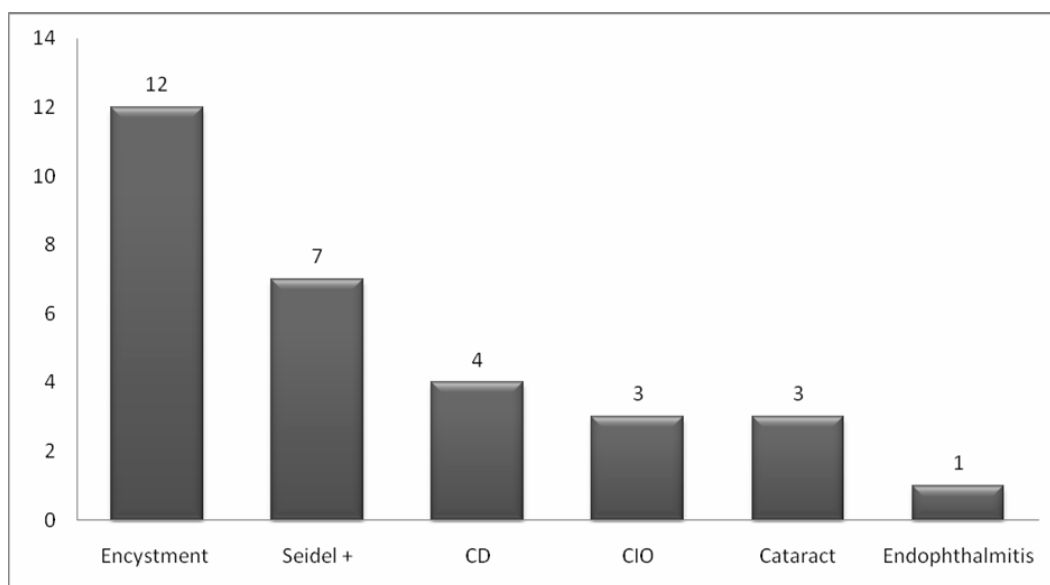
Figure 1**Figure 2**

Figure 3

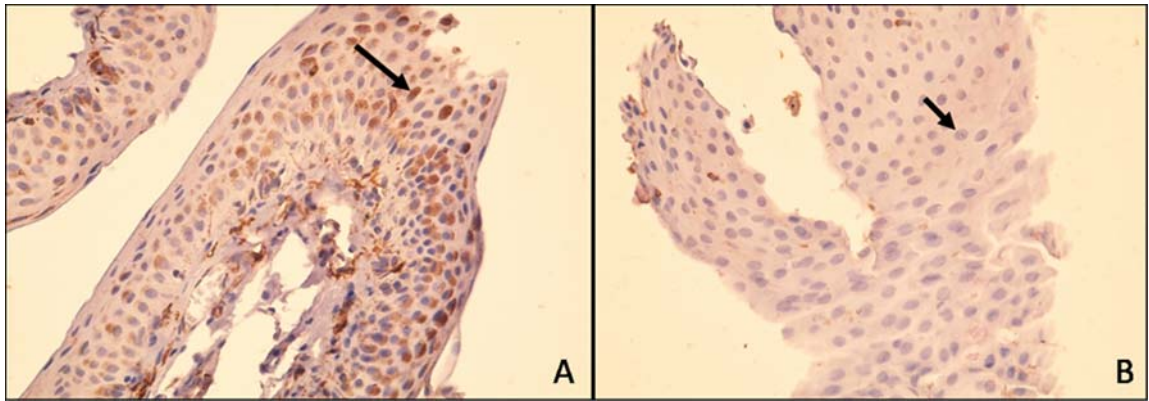


Figure 4

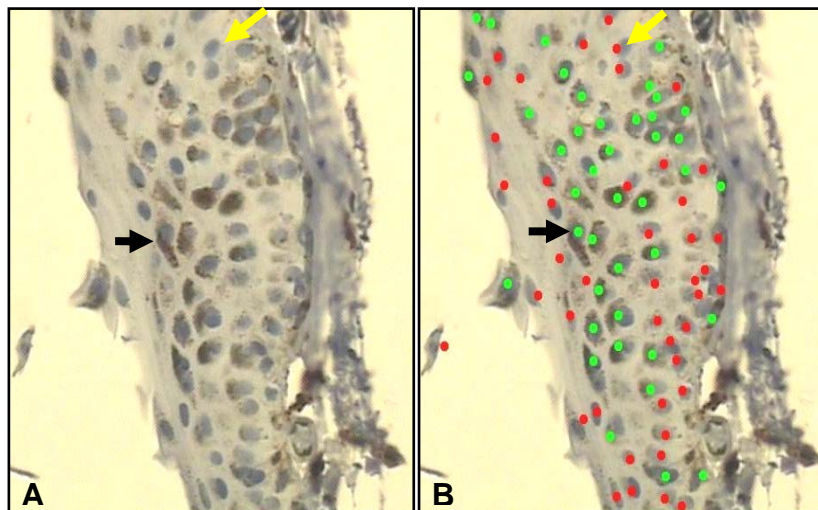


Table: Percentage of HLA-DR+ cells in the 15 eyes with conjunctival inflammation and surgical results (success or failure).

Eyes	HLA-DR + cells (%)	Group at 6 months	Group at 24 months
A	33,94	S	S
B	15,49	S	S
C	21,90	S	S
D	18,30	S	*
E	16,25	S	S
F	20,71	S	*
G	48,09	S	S
H	31,55	S	S
I	15,58	S	S
J	42,79	S	*
K	22,01	S	F
L	23,67	S	F
M	28,00	S	*
N	22,57	F	F
O	47,33	F	F

S = surgical success; F = surgical failure; *loss of follow-up.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)