











## Avaliação dos colírios cetorolaco de trometamina e diclofenaco sódico sem conservantes no epitélio da córnea de coelhos

### Evaluation of the corneal epithelium of rabbits treated with preservative-free eye drops containing ketorolac tromethamine or diclofenac sodium

Fabiana Quartiero Pereira<sup>1</sup> , Melina Barbara Bender<sup>1</sup> , Tanise Carboni da Silva<sup>1</sup> , Bruna Santos dos Santos<sup>1</sup> , Paula Stieven Hünning<sup>1</sup> , Cláudia Skilhan Faganello<sup>1</sup> , Maira Haase Pacheco<sup>1\*</sup> , João Roberto Braga de Mello<sup>1</sup> , Fernanda Bastos de Mello<sup>1</sup> , João Antonio Tadeu Pigatto<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

\*Autor correspondente: [mairahaase@gmail.com](mailto:mairahaase@gmail.com)

#### Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos do cetorolaco de trometamina a 0,5% e do diclofenaco de sódico a 0,1% sem conservantes na córnea de coelhos. Dezesete coelhos da raça Nova Zelândia foram aleatoriamente divididos em três grupos: o grupo de 0,5% de cetorolaco de trometamina, o grupo de 0,1% de diclofenaco sódico e o grupo controle (0,9% de NaCl). Para cada coelho, os dois olhos foram tratados três vezes ao dia durante 90 dias de acordo com o grupo de tratamento. Os epitélios da córnea foram analisados usando microscopia eletrônica de varredura para observar o número de células claras, cinzas e escuras, o número de criptas e a perda do formato celular hexagonal. Ambas as formulações administradas causaram alterações no epitélio da córnea de coelhos. Com exceção da contagem de criptas ( $p < 0,05$ ), todos os parâmetros apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O número de células escuras foi maior no grupo cetorolaco de trometamina ( $p < 0,05$ ). O número de células cinzentas foi maior no grupo diclofenaco de sódio do que no grupo controle ( $p = 0,003$ ). O maior número de células escuras observado foi associado ao menor número de células claras ( $r = -0,577$ ,  $p < 0,001$ ). A perda do formato celular mostrou uma correlação direta com o número de células escuras ( $r = 0,524$ ,  $p = 0,002$ ). O cetorolaco de trometamina 0,5% foi mais tóxico para o epitélio da córnea de coelhos do que o diclofenaco de sódio a 0,1%.

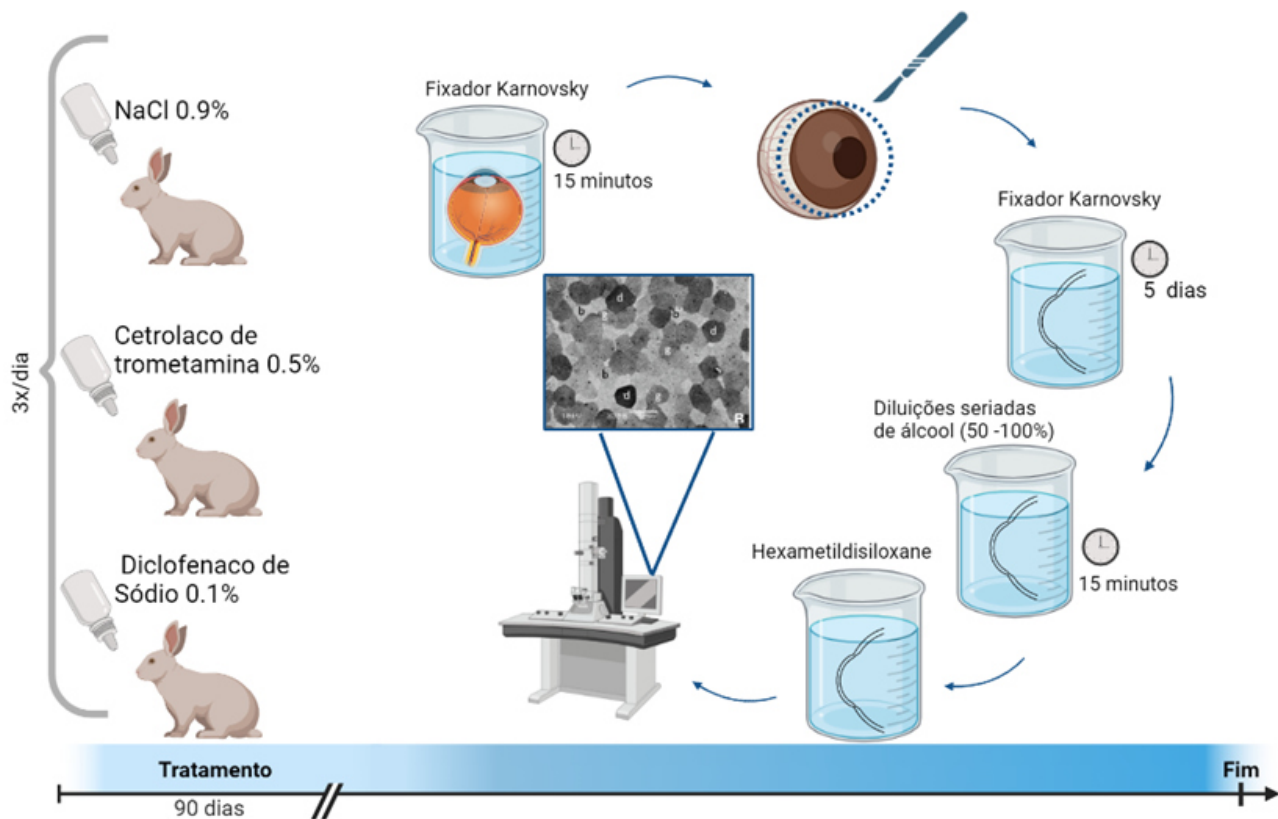
**Palavras-chaves:** córnea; antiinflamatório não esteroide; solução oftálmica; microscopia eletrônica de varredura

#### Abstract

This study aimed to evaluate the corneal epitheliotoxic effects of preservative-free ketorolac tromethamine 0.5% and diclofenac sodium 0.1% eye drops in rabbits. Seventeen New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: the 0.5% ketorolac tromethamine group, the 0.1% diclofenac sodium group, and the control group (0.9% NaCl). For each rabbit, both eyes were treated three times daily according to their treatment group. The corneal epithelia were analyzed using scanning electron microscopy to observe the number of light, grey, and dark cells; the number of epithelial holes; and the loss of hexagonal shape. Both of the formulations administered caused changes in the healthy corneal epithelia of rabbits. Except for number of epithelial holes ( $p < 0.05$ ), all the parameters showed a statistically significant difference between the groups. The number of dark cells was highest in the ketorolac tromethamine group ( $p < 0.05$ ). The number of grey cells was higher in the diclofenac sodium group than in the control group ( $p = 0.003$ ). A higher number of dark cells was associated with a smaller number of light cells ( $r = -0.577$ ,  $p < 0.001$ ). Loss of shape showed a direct correlation with the number of dark cells ( $r = 0.524$ ,  $p = 0.002$ ). Based on the results presented, it was possible to conclude that ketorolac tromethamine 0.5% was more toxic to rabbit corneal epithelium than diclofenac sodium 0.1%.

**Keywords:** cornea; nonsteroidal anti-inflammatory agent; ophthalmic solutions; scanning electron microscopy





**Resumo gráfico** - Avaliação dos colírios cetrolaco de trometamina e diclofenaco sódico sem conservantes no epitélio da córnea de coelhos

## 1. Introdução

Drogas antiinflamatórias não esteróides (AINEs) de aplicação tópica são comumente administradas em pacientes com condições oculares inflamatórias específicas, assim como para prevenir a miose durante a cirurgia de catarata<sup>(1,2)</sup>. As formulações oftálmicas com AINEs são consideradas alternativas mais seguras às contendo corticosteróides para tratamento prolongado<sup>(3,4,5)</sup>. No entanto, o epitélio da córnea é sensível a vários medicamentos tópicos, a dose, o tempo de tratamento e os fatores predisponentes individuais afetam o potencial de toxicidade epitelial da córnea<sup>(6,7)</sup>. Algumas drogas tópicas além de acentuar a descamação celular, podem aumentar o número de microprojeções, o número de células escuras e o número de orifícios epiteliais, assim como também, causar alterações nas junções intercelulares, levando a um aumento do espaço entre as células adjacentes e à perda da forma hexagonal<sup>(3,8)</sup>.

A toxicidade às células epiteliais da córnea *in vitro* das soluções oculares de AINEs comercialmente disponíveis, foi investigada em comparação com as soluções oculares de esteróides, com atenção especial à concentração da droga e tempo de exposição<sup>(2)</sup>. Os coelhos têm sido empregados na avaliação dos efeitos de

drogas no epitélio da córnea<sup>(3,8)</sup>. Alguns estudos relataram a toxicidade de soluções oculares de AINEs comerciais na cicatrização epitelial da córnea<sup>(2,3,9,10,11)</sup>. No entanto, não foram investigados os efeitos da solução ocular de AINE sem conservantes no epitélio da córnea de coelhos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos epiteliotóxicos dos colírios sem conservantes de cetrolaco de trometamina 0,5% e de diclofenaco de sódio 0,1% em córneas de coelhos usando microscopia eletrônica de varredura.

## 2. Materiais e métodos

Foram estudados 17 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, albinos, saudáveis, com 90 dias de idade e peso entre 2 e 2,5 kg. Antes do início do experimento, todos os coelhos passaram por exame oftalmológico. O exame consistiu em avaliação com biomicroscopia de lâmpada de fenda (Portable Slit Lamp SL 15, Kowa, Japão), coloração de fluoresceína (Fluoresceína, Allergan, SP, Brasil), teste lacrimal de Schirmer (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), teste de lissamina verde (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) e tonometria de aplanção (TonoPen® AVIA, Reichert

Technologies, NY, EUA). Não foram encontradas anormalidades nos exames oftalmológicos. O estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (processo número 14-147/2014). Os animais foram mantidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em umidade constante (50–55%) e temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com ciclo claro/escuro de 12 horas (com luz de 8h30 às 20h30) em gaiolas de aço inoxidável. Receberam ração padronizada e água *ad libitum*. Após um período de adaptação de sete dias, os coelhos foram divididos aleatoriamente em três grupos: grupo controle (n=12), grupo cetorolaco de trometamina (n=10) e grupo diclofenaco de sódio (n=12). O alojamento, o manejo e a eutanásia dos animais obedeceram à Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e ao Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e respeitaram os princípios éticos em pesquisa experimental determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as diretrizes práticas de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Os coelhos tiveram ambos os olhos tratados com 1 gota da formulação oftálmica designada três vezes ao dia de acordo com o grupo de testado. Os colírios cetorolaco de trometamina 0,5% (Ophthalmos ind., Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) e diclofenaco de sódio 0,1% Ophthalmos ind., Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) foram manipulados sem conservantes. O grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%). Os três grupos foram avaliados por 90 dias. As superfícies oculares de todos os animais foram examinadas semanalmente usando biomicroscopia de lâmpada de fenda portátil.

Após 90 dias de tratamento, os coelhos foram sacrificados e amostras foram preparadas para serem estudadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A solução fixadora de Karnovsky foi imediatamente instilada na superfície da córnea. Os bulbos oculares foram então enucleados e submersos em solução fixadora de Karnovsky por 15 minutos. Todas as camadas da córnea entraram em contato com o fixador. As córneas foram retiradas por meio de peritomia límbica  $360^\circ$ , com anel córneo-escleral formado com lâmina de bisturi nº 15 a aproximadamente 2 mm do limbo córneo. As amostras foram mantidas em solução fixadora de Karnovsky sob refrigeração por 5 dias para manter a superfície corneana completamente plana. Após a preservação, as amostras foram desidratadas em série de álcool etílico (50, 60, 70, 80, 90 e 100%) por 15 minutos em cada concentração. Posteriormente, as amostras foram dessecadas, sendo o álcool substituído gradativamente por hexametildissilazano para evitar o encolhimento das amostras durante a secagem. As amostras foram envolvidas em porta-amostras com fita condutora de cobre e cola de carbono, com a camada epitelial voltada para cima, e

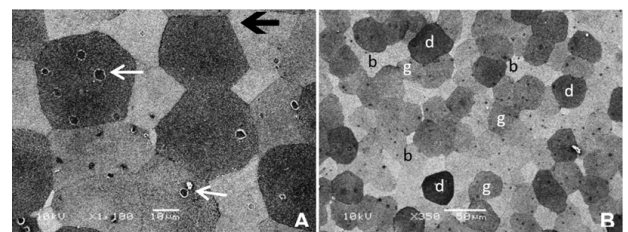
metalizadas com uma camada de 35 nm de ouro e paládio. Cada amostra foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (JSM 6060, JEOL, Tóquio, Japão) operando em 10kV e 15kV. Pelo menos três fotomicrografias da área epitelial central da córnea foram obtidas em diferentes aumentos (350 a 1200x). Foram feitas avaliação a cegas das fotomicrografias. No aumento de 500x, a fotomicrografia continha em média 70 células inteiras, que foram selecionadas aleatoriamente para análise e contadas manualmente por um operador experiente. Adicionalmente, foram observadas as seguintes características: número de células claras, cinzas e escuras; número de orifícios epiteliais; e o grau em que as células perderam sua forma hexagonal. A perda da forma hexagonal foi pontuada de zero a cinco usando um sistema subjetivo e semiquantificado em que uma pontuação de zero indicava que todas as células presentes no campo tinham uma forma hexagonal e uma pontuação de cinco representava a perda total da forma hexagonal. O número de células claras, escuras e cinzas e a perda de forma foram descritos para cada grupo.

## 2.1 Análise estatística

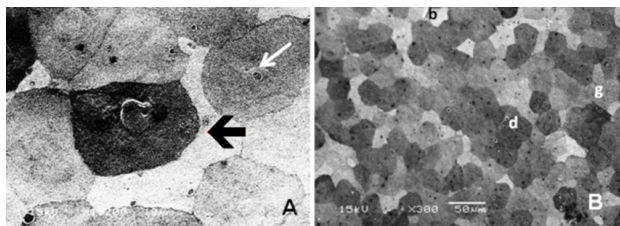
A média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo foram comparados entre os grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis, com o teste de comparação múltipla de Dunn utilizado quando necessário. A amostra inteira e a amostra de cada grupo foram avaliadas quanto ao número de células escuras em comparação com o número de outras células e quanto à perda de forma usando a correlação de Spearman. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

## 3. Resultados

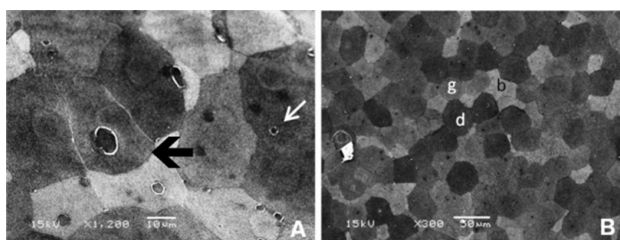
Ao longo do experimento, todas as córneas em ambos os grupos permaneceram normais pela avaliação por biomicroscopia de lâmpada de fenda, e todas as córneas permaneceram negativas para fluoresceína. Com MEV foi possível obter imagens de todas as amostras analisadas (Figuras 1-3).



**Figura 1.** Epitélio corneano saudável (CG) de coelho. Figura 1A: Célula escura em formato hexagonal (seta preta) e presença de orifício epitelial (seta branca). Figura 1B: observam-se células claras (b) e cinzas (g), além de um pequeno número de células escuras (d).



**Figura 2.** Epitélio corneano de coelho do grupo diclofenaco de sódio. A: Célula escura com pontuação 3 para perda da forma hexagonal (seta preta) e presença de orifício epitelial (seta branca). B: Observou-se um número de células cinza (g) e escuras (d), e diminuição do número de células claras (b) em relação ao grupo controle.



**Figura 3.** Epitélio corneano do grupo ceterolaco de trometamina. A: Célula escura com pontuação 4 para perda do formato hexagonal (seta preta) e presença de orifício epitelial (seta branca). B: Há um aumento no número de células cinzas (g) e escuras (d) e uma diminuição no número de células claras (b) em relação ao grupo controle.

A descrição da aparência do epitélio da córnea de coelhos observada por MEV para cada grupo em comparação com o grupo de controle está resumida na Tabela 1 e as comparações múltiplas entre grupos para tipos de células e perda de forma estão na Tabela 2.

**Tabela 1.** Descrição do aspecto do epitélio corneano de coelhos observado por MEV para cada grupo. O número de células claras, cinzas e escuras, o número de orifícios epiteliais e a perda de forma foram descritos (média±DP).

Variável	Grupo			Valor de p
	Controle	Diclofenaco de Sódio	Cetorolaco de Trometamina	
Células escuras	21,2±6	24,2 ±6,3	28,6±3,9*	0,008*
Células cinzas	25,5±4,8	32,1±6,8*	29,4±3,5	0,017*
Células Claras	23,5±4,1	13,8±3,8*	12±3,6*	<0,001*
Orifício epitelial	15,9±12,4	31,4±21,5	21±10,7	0,114
Perda de formato	1,6±0,7	2,8±1,1*	3,7±1,3*	0001*

\*Valores estatisticamente significativos de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (p<0,05) em relação ao grupo controle<sup>1</sup>.

No grupo ceterolaco de trometamina, havia significativamente mais células escuras (p< 0,05) do que nos outros grupos e menos células claras e um alto grau de perda da forma hexagonal em comparação com os grupos controle. O grupo diclofenaco sódico apresentou significativamente mais células cinzas do que o grupo

controle, porém não houve diferença no número de células escuras entre esses dois grupos. No geral, houve uma correlação inversa entre o número de células escuras e o número de células claras; um maior número de células escuras foi associado a um menor número de células claras (r=-0,577, p<0,001). Além disso, a perda de forma foi diretamente correlacionada com o número de células escuras (r=0,524, p=0,002). Em relação ao número de orifícios epiteliais, não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

**Tabela 2.** Comparação múltipla entre os grupos para tipo celular e perda de formato

Variável	Comparação entre grupos	Valor Z	Valor P
Células escuras	Controle x Diclofenaco de Sódio	-1,07	0,283
	Controle x Cetorolaco de Trometamina*	-3,16	0,002*
	Diclofenaco de Sódio x Cetorolaco de Trometamina*	-2,18	0,029*
Células cinzas	Controle x Diclofenaco de Sódio*	-2,93	0,003*
	Controle x Cetorolaco de Trometamina	-1,62	0,106
	Diclofenaco de Sódio x Cetorolaco de Trometamina	1,20	0,228
Células claras	Controle x Diclofenaco de Sódio*	3,77	<0,001*
	Controle x Cetorolaco de Trometamina*	4,24	<0,001*
	Diclofenaco de Sódio x Cetorolaco de Trometamina	0,65	0,513
Perda de formato	Controle x Diclofenaco de Sódio*	-2,27	0,023*
	Controle x Cetorolaco de Trometamina*	-3,55	<0,001*
	Diclofenaco de Sódio x Cetorolaco de Trometamina	-1,41	0,160

Valores estatisticamente significativos de acordo com o teste de comparações múltiplas de Dunn (p<0,05)

## 4. Discussão

Os AINEs tópicos tornaram-se amplamente aceitos para controlar a inflamação ocular <sup>(11,12,13)</sup>, no entanto, este experimento mostrou que o uso de AINEs tópicos comerciais pode induzir algum grau de dano celular ao tecido ocular, de acordo com estudos anteriores <sup>(9,10, 14,15,16,17,18,19)</sup>. Para manter a vida útil do produto e evitar contaminação durante o período de tratamento do paciente, as soluções oftálmicas são formuladas com conservantes <sup>(11)</sup> e esses conservantes utilizados também podem causar toxicidade a superfície ocular <sup>(1,9,20,21)</sup>. Um estudo, conduzido por Stroobants *et al.*, avaliou o efeito de seis colírios de AINEs comerciais no epitélio normal da córnea de coelhos usando MEV <sup>(3)</sup>. Todos os compostos testados causaram alterações e danos às células do epitélio da córnea. Os autores também concluíram que o dano celular parecia estar



relacionado ao ingrediente ativo do colírio, particularmente ao tipo de conservante usado<sup>(3)</sup>. Por isso, é de extrema importância avaliar o efeito farmacológico isolado, portanto, pesquisas sobre o uso de colírios sem conservantes reduzem vieses e promovem resultados mais robustos em relação às formulações testadas. No presente estudo, o efeito de ambos os colírios no epitélio corneano saudável de coelhos foi comparado usando MEV. A MEV tem sido utilizada para observar as características morfológicas quantitativas e qualitativas das células mais superficiais do epitélio corneano<sup>(8,22)</sup>.

No presente estudo, o aspecto geral do epitélio corneano do grupo controle concorda com o descrito em estudos anteriores<sup>(3,8)</sup>. Em particular, na ampliação de 500 ×, o tecido mostrou um mosaico celular ininterrupto com diferentes tonalidades, formas e tamanhos de cinza. Foram observados os três grupos clássicos de células epiteliais (células claras, cinzas e escuras). Esses diferentes tamanhos e formas celulares já foram relatados e parecem estar relacionados ao fenômeno da constante renovação epitelial<sup>(8,22)</sup>. Núcleos celulares eram apenas evidentes em um número extremamente pequeno de células. Quase todas as células eram recobertas por um grande número de orifícios epiteliais, havendo considerável variedade de formas entre as diferentes células<sup>(8,22)</sup>.

As células epiteliais normais têm uma forma hexagonal e as células epiteliais afetadas tendem a perder o padrão hexagonal<sup>(3)</sup>. No presente estudo, o padrão celular foi alterado por ambos os AINEs. O diclofenaco de sódio causou um aumento maior no número de células cinzas e o ceterolaco de trometamina induziu um aumento maior no número de células escuras. A correlação positiva observada entre a perda da forma hexagonal e o aumento do número de células escuras é consistente com os resultados obtidos por Stroobants et al.<sup>(3)</sup>. Mesmo em epitélios saudáveis é possível visualizar células com características diferentes, pois no processo de renovação, as células superficiais tendem a descamar. Porém, com a descamação celular exagerada, a função de barreira do epitélio pode ficar comprometida, permitindo a passagem de substâncias do meio externo para o estroma, resultando em alterações estromais<sup>(8,22)</sup>. De fato, uma maior presença de células escuras tem sido relacionada a um maior grau de esfoliação celular<sup>(8)</sup>.

Ceterolaco de trometamina com conservante de cloreto de benzalcônio pode retardar a regeneração do epitélio da córnea<sup>(15)</sup>. Os conservantes contidos nos colírios podem danificar a superfície epitelial da córnea. O cloreto de benzalcônio é o colírio conservante mais comumente usado e tem sido associado a efeitos tóxicos, como “olho seco”<sup>(9)</sup>. Estudos recentes demonstraram que o cloreto de benzalcônio inibe as mitocôndrias das

células epiteliais da córnea humana<sup>(3)</sup>. Como os colírios utilizados no presente estudo eram isentos de conservantes, podemos inferir que a perda do formato hexagonal e o aumento do número de células escuras observados em ambos os grupos experimentais foram decorrentes da toxicidade dos anti-inflamatórios testados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o ceterolaco de trometamina e o diclofenaco sódio em relação à perda da forma hexagonal ou ao número de orifícios epiteliais. Por Stroobants et al.<sup>(3)</sup> identificaram aumento do número de orifícios epiteliais no epitélio corneano de coelhos tratados com o colírio Voltaren®; esse aumento também foi observado com outras formulações comerciais de diferentes AINEs. Visto que essas formulações utilizavam conservantes diferentes, os autores atribuíram esse aumento ao baixo pH dos veículos.

A observação visual é uma abordagem adequada quando o único objetivo for identificar células com uma proporção alta ou baixa por projeções de superfície. No entanto, para detectar alterações epiteliais precoces, é necessário medir a densidade dos orifícios epiteliais, o tamanho médio das microprojeções e a área da superfície celular coberta por microprojeções. Além disso, uma avaliação visual das características da microprojeção é uma tarefa difícil, mesmo para um especialista, dada a complexidade dos arranjos da microprojeção<sup>(8)</sup>.

## 5. Conclusão

Os achados deste estudo permitem concluir que os AINEs ceterolaco de trometamina 0,5% e diclofenaco sódio 0,1% causam alterações no epitélio corneano de coelhos. O ceterolaco de trometamina 0,5% foi mais tóxico que o diclofenaco sódio 0,1% para o epitélio corneano de coelhos.

### Conflito de interesse

Nenhum dos autores tem quaisquer potenciais conflitos de interesse a divulgar.

### Contribuições do autor

*Conceituação:* F. Q. Pereira, J. R. B. de Mello, J. A. T. Pigatto e F. B. de Mello. *Metodologia:* F. Q. Pereira, P. S. Hünning, C. S. Faganello, B. S. dos Santos, M. B. B. Macedo, J. R. B. de Mello, J. A. T. Pigatto e F. B. de Mello. *Investigação:* F. Q. Pereira, B. S. dos Santos, M. H. Pacheco, T. C. da Silva, J. R. B. de Mello, J. A. T. Pigatto e F. B. de Mello. *Recursos:* J. R. B. de Mello e J. A. T. Pigatto. *Redação (esboço original, revisão e edição):* F. Q. Pereira, B. S. dos Santos, M. H. Pacheco, T. C. da Silva, J. R. B. de Mello e J. A. T. Pigatto.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Centro de Microanálise e Microscopia (CME/UFRGS) pelo apoio para a realização desta pesquisa.

## Referências

1. Flach AJ. Corneal melts associated with topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2001;(99):205-2. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11797308/>)
2. Lee JS, Kim YH, Park YM. The Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory eye drops against human corneal epithelial cells in vitro *Journal of Korean medical science*. 2015;30(12):1856-64. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689832/>)
3. Stroobants A, Fabre K, Maudgal PC. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on the rabbit corneal epithelium studied by scanning electron microscopy. *Bulletin de la Societe belge d'ophtalmologie*. 2000;276:73-82. ([https://www.ophtalmologia.be/download.php?dof\\_id=65](https://www.ophtalmologia.be/download.php?dof_id=65))
4. Guidera AC, Luchs JI, Udell IJ. Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ophthalmology*. 2001;108(5):936-44. ([https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420\(00\)00538-8/fulltext](https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420(00)00538-8/fulltext))
5. Kim SJ, Flach AJ, Jampol LM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in ophthalmology. *Survey of ophthalmology* 2010;55(2):108-33. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20159228/>)
6. Shimazaki J, Saito H, Yang HY. Persistent epithelial defect following penetrating keratoplasty: an adverse effect of diclofenac eyedrops. *Cornea*. 1995;14(6):623-7. ([https://journals.lww.com/corneajrnl/Abstract/1995/11000/Persistent\\_Epithelial\\_Defect\\_Following\\_Penetrating.18.aspx](https://journals.lww.com/corneajrnl/Abstract/1995/11000/Persistent_Epithelial_Defect_Following_Penetrating.18.aspx))
7. Ayaki M, Iwasawa A, Soda M, Yaguchi S, Koide R. Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneal conjunctival cell lines. *Clinical ophthalmology*. 2010;20(4):1019-24. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946991/>)
8. Ferraz LCB, Schellini AS, Gregorio EA. Efeito do colírio de 5-fluorouracil sobre o epitélio corneano íntegro de coelhos. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2003;66(4):493-7. (<https://www.scielo.br/j/abo/a/HXxmrgbpgG4vchsdTPdwNDx/?lang=pt>)
9. Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell AP. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2009;25(2):113-9. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19284328/>)
10. Hashemian MN, Rahimi F, Alipour F, Ahmadraji AA, Torabi HR, Tavakoli N, Moghadam RS. The effect of topical diclofenac sodium 0.1% on the corneal epithelial healing after photorefractive keratectomy. *Iranian Journal of Ophthalmology*. 2011;23(2):27-30. (<https://www.sid.ir/paper/599363/en>)
11. Kawahara A, Utsunomiya T, Kato Y, Takayanagi Y. Comparison of effect of nepafenac and diclofenac ophthalmic solutions on cornea, tear film, and ocular surface after cataract surgery: the results of a randomized trial. *Clinical ophthalmology*. 2016;4(10):385-91. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786065/>)
12. Aragona P, Tripodi G, Spinella R, Laganá E, Ferreri G. The effects of the topical administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs on corneal epithelium and corneal sensitivity in normal subjects. *Eye*. 2000;(14):206-10. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10845018/>)
13. Duan P, Liu Y, Li J. The comparative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of anterior chamber inflammation after cataract surgery: a systematic review and network meta-analysis. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology [Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie]*. 2017;255(4): 639-49. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28130595/>)
14. Barba KR, Samy A, Lai C, Perlman JI, Bouchard CS. Effect of topical anti-inflammatory drugs on corneal and limbal wound healing. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2000;26(6):893-7. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10889437/>)
15. Gaynes BI, Onyekwuluje A. Topical ophthalmic NSAIDs: a discussion with focus on nepafenac ophthalmic suspension. *Clinical ophthalmology*. 2008;2(2):355-68. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2693998/>)
16. Wilson DJ, Schutte SM, Abel SR. Comparing the efficacy of ophthalmic NSAIDs in common indications: a literature review to support cost-effective prescribing. *The Annals of pharmacotherapy* 2015 49(6):727-34. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25725037/>)
17. Iwamoto S, Koga T, Ohba M, Okuno T, Koike M, Murakami A, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug delays corneal wound healing by reducing production of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid, a ligand for leukotriene B<sub>4</sub> receptor 2. *Scientific Reports*. 2017;7(1):13267. (<https://www.nature.com/articles/s41598-017-13122-8>)
18. Raizman MB, Hamrah P, Holland EJ, Kim T, Mah FS, Rapuano CJ, Ulrich RG. Drug-induced corneal epithelial changes. *Survey of ophthalmology*. 2017;62(3):286-301. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27890620/>)
19. Rigas B, Huang W, Honkanen R. NSAID-induced corneal melt: Clinical importance, pathogenesis, and risk mitigation. *Survey of ophthalmology*. 2020;65(1):1-11. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31306671/>)
20. Guo Y, Satpathy M, Wilson G, Srinivas SP. Benzalkonium chloride induces dephosphorylation of myosin light chain in cultured corneal epithelial cells *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(5):936-44. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17460253/>)
21. Uematsu M, Mohamed YH, Onizuka N, Ueki R, Inoue D, Fujikawa A. Acute corneal toxicity of latanoprost with different preservatives. *Cutaneous and ocular toxicology* 2015;35(2):1-6. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26113030/>)